

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Fisiología (Fisiología Animal II)



**ESTEROIDES SEXUALES EN CIPRÍNIDOS. CICLO
ESTACIONAL, DINÁMICA DE LIBERACIÓN AL AGUA,
AFINIDAD POR LAS PROTEÍNAS PLASMÁTICAS Y
SENSIBILIDAD OLFATORIA EN LA TENCA
("TINCA TINCA", L.)**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

María Luisa Pinillos Bueno

Bajo la dirección de los doctores
María Jesús Delgado Saavedra
Alexander P.Scott

Madrid, 2003

ISBN: 84-669-1713-6

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5310943557

TESIS DOCTORAL

ESTEROIDES SEXUALES EN CIPRÍNIDOS.
CICLO ESTACIONAL, DINÁMICA DE LIBERACIÓN AL AGUA, AFINIDAD
POR LAS PROTEINAS PLASMÁTICAS Y SENSIBILIDAD OLFATORIA EN
LA TENCA (*Tinca tinca*, L.)



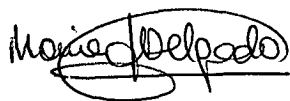
María Luisa Pinillos Bueno
Madrid, Julio de 2003

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DPTO. DE FISIOLÓGÍA (FISIOLÓGÍA ANIMAL II)

TESIS DOCTORAL

ESTEROIDES SEXUALES EN CIPRÍNIDOS. CICLO ESTACIONAL,
DINÁMICA DE LIBERACIÓN AL AGUA, AFINIDAD POR LAS
PROTEÍNAS PLASMÁTICAS Y SENSIBILIDAD OLFATORIA EN LA
TENCA (*Tinca tinca*)

Vº Bº Directora



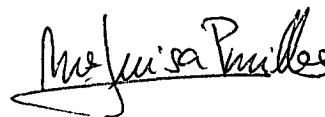
María Jesús Delgado Saavedra

Vº Bº Director



Alexander P. Scott

Doctoranda



María Luisa Pinillos Bueno

Memoria presentada por María Luisa Pinillos Bueno
para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas
Madrid, Julio de 2003

Dña. María J. Delgado Saavedra, Profesora Titular de Universidad, en el Departamento de Fisiología (Fisiología Animal II), de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid, y

D. Alexander P. Scott, Profesor Investigador en “The Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science”, dependiente del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación en el Reino Unido,

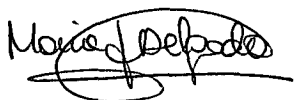
INFORMAN:

Que la Tesis Doctoral titulada “Esteroides sexuales en ciprínidos. Ciclo estacional, dinámica de liberación al agua, afinidad por las proteínas plasmáticas y sensibilidad olfatoria en la tenca (*Tinca Tinca*, L.)” ha sido realizada por **Dña. María Luisa Pinillos Bueno** bajo nuestra dirección, en los centros:

- Departamento de Fisiología (Fisiología Animal II), Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid, y
- “The Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science”, Lowestoft y Weymouth, Reino Unido.

Cumpliendo los requisitos necesarios para optar a la mención de Doctorado Europeo. Por tanto, damos nuestra conformidad para su presentación ante la Comisión de Doctorado de la Universidad Complutense de Madrid.

En Madrid a 29 de junio de 2003.



Fdo. Dra. María J. Delgado Saavedra



Fdo. Dr. Alexander P. Scott

“Y al manteneros unidos al trabajo,
en verdad estáis amando la vida.
Y amar la vida a través del trabajo,
es estar iniciado en el más íntimo secreto de la vida.”

ABREVIATURAS

11-KT	11-cetotestosterona
15-keto-PGF_{2α}	15-ceto-prostaglandina F 2 α
17α-P	17α-dihidroxiprogesterona
17,20α-P	17,20α,diihidroxi-4-pregnen-3-ona
17,20β,21-P	17,20β,21-trihidroxi-4-pregnen-3-ona
17,20β-P	17α,20β-dihidroxi-4-pregnen-3-ona
20β-HSD	20β-esteroide-deshidrogenasa
AD	Androstenediona
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
DA	Dopamina
E₂	17β-estradiol
EOG	Electro-olfatograma
Esteroides C₁₈	Esteroides de 18 átomos de carbono
Esteroides C₁₉	Esteroides de 19 átomos de carbono
Esteroides C₂₁	Esteroides de 21 átomos de carbono
FSH	Hormona estimulante del folículo
GABA	Ácido γ-aminobutírico
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
GnRHα	Análogo de la hormona liberadora de gonadotropinas
GTH	Gonadotropina
HCG	Gonadotropina coriónica humana
LH	Hormona luteinizante
MIH	Hormona inductora de la maduración
MPF	Factor promotor de la maduración
NPY	Neuropéptido Y
PG	Prostaglandina
PGF_{2α}	Prostaglandinas F 2 α
RIA	Radioinmunoensayo
SSBP	Proteínas plasmáticas transportadoras de esteroides (<i>"Sex Steroid Binding Protein"</i>)
T	Testosterona

Índice

1. Introducción general.....	1
1.1. Estrategias reproductoras en los peces teleósteos.....	2
1.2. Las gónadas en los teleósteos	3
1.2.1. Testículo	3
1.2.2. Ovario.....	4
1.2.2.1. Etapas del desarrollo ovárico	6
1.3. Hormonas del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal	8
1.3.1. Hipotálamo-hipófisis	8
1.3.2. Esteroides gonadales	11
1.4. Control endocrino del desarrollo gonadal.....	13
1.4.1. Espermatogénesis.....	13
1.4.2. Ovogénesis y maduración del folículo ovárico	15
1.5. Feromonas sexuales y comunicación intraespecífica en la reproducción	19
1.5.1. Definición de feromona y papel de las feromonas sexuales	19
1.5.2. Tipos y naturaleza química de las feromonas	20
1.5.3. Órgano olfatorio en los peces.....	21
1.5.4. Detección olfatoria: Registro electro-olfatograma	23
1.5.5. Sistema feromonal en ciprinidos	23
2. Objetivos generales	25
3. Capítulo I: Caracterización del ciclo reproductor estacional en el ciprinido	
<i>Tinca tinca</i>	28
3.1. Objetivos y diseño experimental.....	29
3.2. <u>Artículo 1</u> : “Seasonal changes in plasma gonadal steroid concentrations and gonadal morphology of male and female tench (<i>Tinca tinca</i> , L.)”	32
4. Capítulo II: Liberación de esteroides sexuales al agua en los peces.....	58
4.1. Objetivos y diseño experimental.....	59
4.2. <u>Artículo 2</u> : “Why measure steroids in fish plasma when you can measure them in water?”	62
4.3. <u>Artículo 3</u> : “Release of sex steroid to the water by female brook trout (<i>Salvelinus fontinalis</i>) and giant danio (<i>Brachydanio aequipinnatus</i>) after the induction of the ovulation for Ovaprim”	72
5. Capítulo III: Liberación de esteroides sexuales al agua por la tenca.	
Registro de la detección de dichos esteroides mediante electro-olfatograma	96
5.1. Objetivos y diseño experimental.....	98
5.2. <u>Artículo 4</u> : “Changes in plasma and water sex steroid concentrations in male and female tench <i>Tinca tinca</i> in response to injection of gonadotropin-releasing hormone”	102
5.3. <u>Artículo 5</u> : “Olfactory Sensitivity to C ₂₁ Steroids and Prostaglandins in the Freshwater Cyprinid, <i>Tinca tinca</i> ”	133

5.3. <u>Artículo 5</u> : “Olfactory Sensitivity to C ₂₁ Steroids and Prostaglandins in the Freshwater Cyprinid, <i>Tinca tinca</i> ”	133
6. Capítulo IV: Incorporación de esteroides sexuales disueltos en el agua en relación con su afinidad por las proteínas transportadoras de esteroides en <i>Tinca tinca</i>.	157
6.1. Objetivos y diseño experimental.....	158
6.2. <u>Artículo 6</u> : “The rate of uptake of sex steroids from water by tench <i>Tinca tinca</i> L. is influenced by their affinity for plasma sex steroid binding protein”	161
7. Discusión general	190
8. Conclusiones	208
9. Bibliografía	211



1. Introducción general

1.1. Estrategias reproductoras en los peces teleósteos

La reproducción sexual es un complejo conjunto de procesos que culmina con la producción del cigoto. Incluye el desarrollo gonadal, la maduración de las células germinales, la liberación de los gametos y la fecundación. La actividad reproductora concluye con éxito cuando la descendencia sobrevive para, a su vez, poder reproducirse.

Los teleósteos son el grupo de vertebrados de mayor diversidad, y este hecho se refleja en una notable variedad de estructuras y patrones reproductores. La mayoría de las especies, tienen sexos separados, aunque también podemos encontrar especies hermafroditas que pueden ser, hermafroditas secuenciales, en las que un individuo de determinado sexo se transforma en un momento dado en el sexo opuesto, o hermafroditas sincrónicos, cuando un individuo posee ovarios y testículos funcionales de forma simultánea. La vida en el agua garantiza un medio físico-químico relativamente estable, en el que puede tener lugar la fecundación externa. La mayoría de los teleósteos son ovíparos, aseguran el éxito reproductor produciendo gran cantidad de huevos de pequeño tamaño, a menudo miles de una vez, que son liberados antes de ser fecundados al medio acuático. El comportamiento del macho, necesariamente ha de estar sincronizado con la oviposición, de manera que el esperma es liberado sobre los huevos recién puestos, fecundándolos. No obstante, existen algunas especies de teleósteos que son ovovivíparas, en las que el huevo es fecundado dentro del folículo retenido en el oviducto, y vivíparas, en las cuales tras una fecundación interna se establece un contacto entre el cigoto y las paredes del oviducto, a través del cual se produce el intercambio gaseoso y de nutrientes.

Para asegurar la supervivencia de la descendencia, los peces ajustan sus ciclos de puesta reproduciéndose cuando las condiciones climáticas son favorables, no hay mucha presión predatoria y la disponibilidad de alimento está garantizada. En latitudes altas los cambios estacionales vienen marcados por variaciones en el fotoperíodo y en la temperatura. En estas latitudes los patrones reproductores temporales que presentan los peces de agua dulce se pueden clasificar en tres categorías. La primera corresponde a aquellos peces en los que el desove se produce en otoño o principios de invierno. En este grupo se encuentran los salmónidos, cuyos huevos de tamaño relativamente grande son enterrados por la hembra en la grava del fondo, donde el desarrollo larvario se produce muy lentamente. En primavera, cuando la larva ha absorbido todo el vitelo se produce la eclosión de una larva de gran tamaño, en comparación con la de otros teleósteos. Un segundo patrón lo observamos en las especies en las que la gametogénesis ocurre durante

el otoño y el invierno. La hembra libera todos huevos en una sola puesta, que tiene lugar en primavera o a principios de verano, normalmente en aguas remansadas poco profundas, donde la temperatura del agua aumenta en poco tiempo. La eclosión de los huevos se produce rápidamente, en la misma estación del año en la que tuvo lugar la puesta. La tercera categoría la constituyen los peces que desovan en verano. En estas especies, el desarrollo ovárico tiene lugar durante el otoño y el invierno, en primavera se produce la maduración ovárica, y la puesta ocurre al final de la primavera o en el verano. Normalmente, el desove muestra un patrón intermitente, la hembra pone diferentes lotes de huevos durante la estación reproductora, que puede prolongarse por dos o tres meses. Los huevos suelen ser muy pequeños y se desarrollan rápidamente en las aguas cálidas del verano.

1.2. Las gónadas en los teleósteos

Salvo en ciertas excepciones, las gónadas de los teleósteos son órganos pares, estructuras alargadas adheridas a la cavidad corporal a través de la cara interna del mesenterio. En muchas especies, las paredes de las gónadas se alargan formando los gonoductos, los cuales se fusionan originando un único conducto antes de alcanzar el poro genital.

1.2.1. Testículo

Los testículos se conectan al exterior por medio del conducto deferente que llega hasta la papila genital. En función del modo de diferenciación del tejido germinal, en los peces encontramos dos patrones de estructura testicular: lobular y tubular (Billard *et al.*, 1982). El testículo lobular es el que presentan la mayoría de los teleósteos y está formado por túbulos, aunque debido a la variabilidad en su diámetro, en secciones histológicas, parecen lóbulos. Los túbulos están limitados por una membrana basal que divide al testículo en dos compartimentos, intertubular e intratubular. Dentro de los túbulos, las espermatogonias primarias experimentan divisiones mitóticas quedando envueltas por las células de Sertoli, constituyendo los espermatocistos (Callard, 1991). Las sucesivas divisiones de las espermatogonias las transformarán en espermatocitos primarios, que entran en meiosis y tras la primera división meiótica se denominarán espermatocitos secundarios. Cuando la segunda división meiótica concluye se transforman en espermátidas. En la espermiogénesis, que consiste en la reorganización del núcleo y

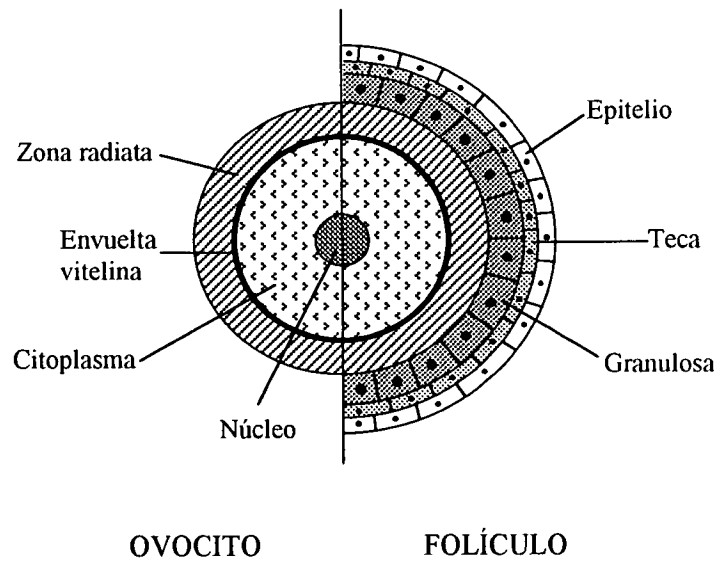
citoplasma junto con el desarrollo del flagelo, la espermatida se transforma en espermatozoide. En la época de cría, y tras la ruptura de los espermatocistos, los espermatozoides son liberados al lumen del túbulo. El testículo se hidrata y el espermatozoide es eyaculado al interior del conducto espermático en un proceso conocido como espermiación. Tras liberar los espermatozoides al lumen, las células de Sertoli forman una barrera a lo largo de las paredes del túbulo, conocida como barrera hematotesticular, de forma que no hay un contacto directo entre los espermatozoides y el torrente sanguíneo. Esta barrera mantiene un microambiente favorable para la supervivencia de los espermatozoides. Las células de Sertoli, además de aportar a las células germinales un soporte, y permitir la formación de la barrera hematotesticular, también están implicadas en la fagocitosis de cuerpos residuales, en la secreción de sustancias nutritivas al lumen y en la esteroidogénesis testicular (Grier, 1993). En los espacios intersticiales encontramos células de Leydig, fibroblastos, vasos sanguíneos y linfáticos.

El testículo de tipo tubular es poco común, sólo se encuentra en peces ateriformes y se caracteriza porque no presenta lumen. Las espermatogonias primarias se localizan al final ciego del tubo y, a medida que la espermatogénesis y la espermiogénesis tienen lugar, los espermatocistos van avanzando hacia los conductos deferentes (Billard *et al.*, 1982).

1.2.2. Ovario

El ovario de los teleósteos es de tipo cistovárico, es decir contiene un lumen (el ovocele) al cual se liberan los huevos durante la ovulación. En otras subclases de peces el ovario es de tipo gimnovárico, y se diferencia del anterior en que los ovocitos se liberan directamente a la cavidad peritoneal. A través del oviducto, los huevos (o larvas en el caso de las especies vivíparas) salen al exterior por el poro genital. Sin embargo, en algunas especies, como sucede en los salmónidos, se produce una regresión del oviducto y los huevos son liberados a la cavidad peritoneal antes de alcanzar el poro genital.

Desde un punto de vista funcional y morfológico, la unidad básica del ovario es el folículo ovárico (Esquema 1), cuya organización es similar en la mayoría de los teleósteos. El ovocito en desarrollo está localizado en el centro del folículo y rodeado por una capa acelular, la envuelta vitelina, que formará la zona radiata o futura envuelta del huevo; y una serie de células foliculares organizadas en varias capas, una monocapa interna o capa de células de la granulosa, y una o dos subcapas externas formadas por las células de la teca. Ambas capas celulares están separadas por una membrana basal.



Esquema 1. Representación de un ovocito (izda.) y un folículo ovárico (dcha.) mostrando los distintos elementos que los constituyen (Modificado de Tyler y Sumpter, 1996).

Las células de la granulosa son homogéneas desde un punto de vista histológico, y es en esta capa donde se sitúan las células responsables de la formación del micropilo (abertura en la zona radiata tras la ovulación, que permite el acceso del esperma durante la fecundación). La composición de la capa de las células de la teca es más heterogénea, encontrándose en ella células especiales de la teca, capilares y fibroblastos (Tyler y Sumpter, 1996)

El desarrollo ovárico puede ser de tipo sincrónico, en el que todos los folículos se desarrollan de forma simultánea, encontrándose generalmente dos poblaciones de ovocitos en desarrollo; o asincrónico, en el que se observa una población heterogénea de folículos en distintos estadios (Scott, 1987). Hay que tener en cuenta que los términos asincrónico y sincrónico describen dos extremos de un proceso continuo y en los teleósteos existen todas las estrategias intermedias posibles.

En los intersticios foliculares del ovario de los teleósteos encontramos grupos de ovogonias que, a diferencia de lo que ocurre en la mayoría de los vertebrados, proliferan durante toda la vida adulta.

1.2.2.1. Etapas del desarrollo ovárico

En todas las especies de teleósteos estudiadas hasta la fecha, el desarrollo del ovocito sigue un patrón similar en el que se pueden distinguir 6 etapas consecutivas: ovogénesis, crecimiento primario, estado cortico-alveolar, vitelogénesis, maduración y ovulación (Bromage y Cumaranatunga, 1988). Si bien es cierto que al ser el crecimiento del ovocito un proceso continuo, los límites de algunas de estas fases se pueden superponer.

- *Ovogénesis*. Es la transformación de las ovogonias en ovocitos primarios y se realiza durante la primera división meiótica. En la diplotene de la profase de esta primera división meiótica se detiene la meiosis iniciándose el crecimiento citoplasmático del ovocito y la formación del folículo ovárico.

- *Crecimiento primario del ovocito*. El inicio de esta etapa se caracteriza por un periodo de abundante síntesis de ARN. Aparecen los denominados cuerpos de Balbiani, complejos formados por diferentes orgánulos citoplasmáticos (mitocondrias, retículo endoplasmático, aparato de Golgi) junto con material fibrogranular. Durante esta etapa de crecimiento primario se desarrolla la envuelta vitelina que rodea al ovocito, cuya complejidad aumentará notablemente a lo largo del crecimiento del mismo, llegando a constituir el futuro corion o envuelta definitiva del huevo (Nagahama, 1983). Las proteínas que forman el corion son sintetizadas en el hígado bajo el estímulo del 17β -estradiol y son transportadas en la sangre hasta el ovocito en crecimiento (Hamazaki *et al.*, 1989). Hacia el final de esta fase de crecimiento primario del ovocito se forma el verdadero folículo ovárico, constituido por el ovocito y las capas de células foliculares que lo rodean.

- *Estado cortico-alveolar*. Durante esta etapa aparecen unas estructuras citoplasmáticas distinguibles al microscopio óptico denominadas alveolos corticales (Selman y Wallace, 1989), que contienen una sialoglicoproteína de alto peso molecular sintetizada endógenamente por el propio ovocito. Los alveolos corticales, al finalizar esta fase, acaban ocupando todo el citoplasma del ovocito, siendo desplazados hacia la periferia citoplasmática en la siguiente fase de vitelogénesis. Cuando se produce la fecundación, el contenido de estos alveolos es vertido al espacio perivitelino endureciendo la cubierta vitelina y evitando, de este modo, la poliespermia (Kobayashi, 1985; Kitajima *et al.*, 1994).

Además, durante esta fase corticoalveolar, pueden observarse con frecuencia inclusiones lipídicas difíciles de discernir de los alveolos corticales (Selman y Wallace, 1989). El color anaranjado de estas gotas lipídicas, característico de los pigmentos carotenoides asociados al componente lipídico de las vitelogeninas, ha llevado a sugerir que dichas inclusiones podrían proceder de vitelogeninas que inician su incorporación al ovocito (Selman y Wallace, 1986, 1989).

- *Vitelogénesis*. Es el proceso estimulado por estradiol que incluye la síntesis hepática del precursor de las proteínas del vitelo, su secreción y transporte en sangre y, la incorporación del mismo al ovocito. Es el principal proceso responsable del aumento de tamaño del ovocito, etapa durante la cual se alcanza hasta el 95% del tamaño final del huevo (Tyler, 1991). La duración de este proceso depende del patrón de desarrollo ovárico de la especie. Así, en especies que muestran una única puesta anual, como los salmónidos, la vitelogénesis puede prolongarse hasta alcanzar una duración de 9 meses (Tyler *et al.*, 1990), mientras que en especies con freza intermitente la vitelogénesis es notablemente más corta, por ejemplo, en la lubina se ha descrito una duración de aproximadamente 5 semanas (Carrillo *et al.*, 1989). Las vitelogeninas son fosfoglicolipoproteínas de alto peso molecular que unen calcio, cuya estructura es bastante similar en los distintos teleósteos estudiados (Specker y Sullivan, 1994). Datos recientes indican que, en ciertas especies de teleósteos, pueden encontrarse dos formas distintas de vitelogeninas con distinta funcionalidad en el desarrollo del huevo (Matsubara *et al.*, 1999). Las moléculas de vitelogenina abandonan los capilares situados entre las células de la teca, atravesando la lámina basal y los intersticios de las células de la granulosa hasta alcanzar la superficie del ovocito. La captación selectiva de vitelogenina por el ovocito se realiza por endocitosis mediada por receptor (Chan *et al.*, 1991; Specker y Sullivan, 1994), estando tanto el número de receptores (Lancaster y Tyler, 1994) como la afinidad de éstos por la vitelogenina (Chan *et al.*, 1991) regulados durante la fase de crecimiento vitelogénico. Una vez en el interior del ovocito, la vitelogenina es transformada enzimáticamente para formar los dos grupos de proteínas que componen el vitelo, las lipovitelininas y las fosfoproteínas, proteínas que constituyen la fuente de energía y los sustratos a partir de los cuales se desarrollará el futuro embrión.

- *Maduración*. En esta etapa se produce la transformación del ovocito en un huevo preparado para ser fecundado. Hace algunas décadas el término maduración hacía

referencia al periodo completo de rápido crecimiento folicular que precede a la ovulación. Posteriormente, se ha introducido el término “maduración final del ovocito” para distinguir entre el crecimiento folicular y la maduración del propio ovocito. Cuando el ovocito ha completado la vitelogénesis, el núcleo, ahora denominado vesícula germinal (que se encuentra detenido en la profase de la primera división meiótica) está situado en el centro del ovocito. La maduración comienza con la migración de la vesícula germinal hacia la periferia del polo animal, lo que se correlaciona con la adquisición de la “competencia” para la maduración del ovocito. Tras la ruptura de la vesícula germinal, se reanuda la meiosis (“maduración final del ovocito”) inducida por la hormona inductora de la maduración (MIH) y se produce la expulsión del primer corpúsculo polar. De nuevo la meiosis se detiene, ahora en la metafase de la segunda división meiótica, y únicamente se reanudará si tiene lugar la fecundación (Tyler y Sumpter, 1996).

- *Ovulación.* La ovulación hace referencia a la liberación del huevo de su cubierta folicular y expulsión del mismo a la cavidad peritoneal o al lumen del ovario. Para que este proceso se realice se requiere, por un lado que el ovocito se separe de las células foliculares, por otro la formación de un orificio en las capas foliculares, y finalmente la expulsión activa del huevo a través de dicho orificio gracias a la contracción de las fibras de músculo liso situadas en la capa de las células de la teca.

1.3. Hormonas del eje hipotálamo-hipófisis-gónadal

1.3.1 Hipotálamo-hipófisis

En los teleósteos, al igual que sucede en otros vertebrados, el eje hipotálamo-hipófisis desempeña un papel clave en la regulación de la actividad gonadal. El principal factor neuroendocrino hipotalámico reconocido como estimulador de la producción hipofisaria de gonadotropinas (GtH) es la hormona liberadora de gonadotropinas o GnRH (Peter *et al.*, 1986). En los teleósteos se han identificado varias formas de GnRH, todas ellas son deca péptidos que muestran una gran conservación en su secuencia (Yaron, 1995). Aunque todas las formas de GnRH identificadas muestran actividad liberadora de gonadotropinas, no todas son reguladores endógenos de la síntesis y/o la liberación de las gonadotropinas (rev. Holland *et al.*, 1998). Los análogos sintéticos de GnRH, en los que los aminoácidos L de la posición 6 son sustituidos por aminoácidos D, y la glicina del

extremo carboxi terminal es reemplazada por una etilamina, son los más resistentes a la degradación enzimática, tanto en la hipófisis, como en el riñón y el hígado, lo que les confiere una actividad biológica superior (Zohar *et al.*, 1990).

Datos recientes indican que la GnRH, además de su función estimuladora sobre las células gonadotropas hipofisarias, puede ejercer en modelos *in vitro* una acción directa de tipo autocrina/paracrina sobre la ruptura de la vesícula germinal del ovocito e incluso en ciertos casos, estimulando la esteroidogénesis ovárica (Pati y Habibi, 2000).

La hipófisis contiene dos tipos de sitios de unión para GnRH, uno de alta afinidad y baja capacidad y otro de baja afinidad y alta capacidad, y todas las formas de GnRH conocidas se unen a estos sitios de unión (Habibi *et al.*, 1987). Dichos sitios de unión experimentan variaciones anuales en su densidad, siendo más abundantes durante la recrudescencia gonadal (Habibi *et al.*, 1989).

En la mayoría de los ciprínidos estudiados hasta la fecha, el control inhibitorio de la producción adenohipofisaria de gonadotropinas se ejerce principalmente por la dopamina (DA) (Peter y Yu, 1997). Estudios realizados en células hipofisarias de carpín utilizando agonistas y antagonistas específicos de receptores dopaminérgicos concluyen que la inhibición dopaminérgica sobre la liberación de GtH está mediada por receptores D₂ situados en los gonadotropos (Chang *et al.*, 1990).

Los teleósteos carecen de sistema portal hipotálamo-hipófisis, existiendo una innervación directa de la adenohipófisis procedente de neuronas hipotálamicas que sintetizan diferentes neuropéptidos y neurotransmisores, y que están implicados en la regulación de la liberación de gonadotropinas (Peter *et al.*, 1990). El neuropeptido Y (NPY), el ácido γ -aminobutírico (GABA), la taurina, el glutamato, el aspartato, la noradrenalina y la serotonina son, entre otros, algunos de dichos neuromoduladores (Kah *et al.*, 1993; Khan y Thomas, 1999). Así mismo, se han descrito nervios colinérgicos que también participan en esta regulación (Mikolajczyk *et al.*, 1993).

En los peces existen dos moléculas de gonadotropinas secretadas por la *pars distalis* de la hipófisis, la GtH-I y la GtH-II, estructuralmente similares a la hormona estimulante del folículo (FSH) y a la hormona luteinizante (LH) de mamíferos, respectivamente (Quérat, 1994). Son glicoproteínas formadas por dos subunidades unidas entre sí por uniones no covalentes. La subunidad α tiene idéntica composición en ambas gonadotropinas y las secuencias de aminoácidos de las subunidades β muestran un 31% de similitud (Kawauchi *et al.*, 1989). De forma general, se admite que las gonadotropinas

liberadas por la adenohipófisis estimulan la maduración y esteroidogénesis gonadal, y a su vez los esteroides gonadales modulan la liberación de las gonadotropinas tanto a nivel hipotalámico como hipofisario, cerrándose de este modo el bucle de retroalimentación del eje (Kobayashi *et al.*, 2000; Cavaco *et al.*, 2001).

En cuanto a las funciones de estas gonadotropinas, la GtH-I se ha relacionado con la regulación de la vitelogénesis, y la GtH-II desempeña un papel principal en la maduración final del ovocito y la ovulación (rev. Arukwe y Goksoyr, 2003). La mayoría de los datos disponibles sobre las funciones de la GtH-I en la regulación gonadal proceden de trabajos realizados en salmónidos, donde se le atribuye un papel importante en la esteroidogénesis gonadal (Swanson, 1991). No obstante, tenemos un conocimiento limitado de su control neuroendocrino. Suzuki y colaboradores (1988) observaron que la concentración plasmática de GtH-I supera a la de GtH-II en ejemplares sexualmente maduros de trucha arco iris, mientras que la concentración plasmática de GtH-II supera a la de GtH-I en animales próximos a la freza. En el carpín, la recrudescencia gonadal se corresponde con altos niveles de GtH-II (Habibi *et al.*, 1987). Sin embargo, inmediatamente antes del desove se observa un incremento agudo en la liberación de GtH-II, que añadido a la ya elevada concentración basal de esta hormona circulante, origina un máximo anual de GtH-II que parece ser la señal necesaria para que se produzca la espermiación y la ovulación. Resultados similares se han obtenido en salmónidos, donde la GtH-I se encuentra elevada en el plasma durante la ovogénesis, mientras que la concentración plasmática de GtH-II aumenta antes de producirse la ovulación (Swanson *et al.*, 1991, Oppen-Bersten *et al.*, 1994).

Además de los ciclos anuales de GtH-II, se han descrito ciclos diarios en la liberación de GtH-II durante la recrudescencia gonadal en machos y hembras de carpín (Hontela y Peter, 1978), y en hembras de trucha arco iris (Zohar *et al.*, 1982). Periodos de grandes fluctuaciones diarias en la concentración plasmática de GtH-II se correlacionan con una alta actividad gonadal. De hecho, se ha sugerido que para estimular el desarrollo gonadal es más importante el mantenimiento de estos pulsos diarios en la secreción de GtH-II que una alta concentración de GtH-II *per se* (Hontela y Peter, 1980). En concordancia con estos resultados, también se han observado variaciones diarias en la sensibilidad a la GtH-II, sugiriéndose la existencia de posibles variaciones en el número y/o en la actividad de los receptores para esta hormona (Hontela y Peter, 1983).

Estudios recientes han permitido aislar dos subtipos de receptores para gonadotropinas en folículos ováricos de carpa, y aunque ambos unen GtH-I y GtH-II, cada

receptor muestra una unión preferente por una de las dos gonadotropinas (Basu y Bhattacharya, 2002).

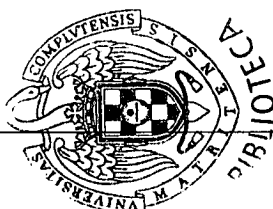
1.3.2. Esteroides gonadales

Los esteroides gonadales derivan del colesterol el cual es convertido a pregnenolona, precursor de estrógenos, andrógenos, y progestágenos (Esquema 2). Los estrógenos, con 18 átomos de carbono (C_{18}), desempeñan un papel importante en la diferenciación sexual y en la vitelogénesis. Los andrógenos, esteroides C_{19} , son los responsables de la conducta sexual en machos, así como del desarrollo de los caracteres sexuales secundarios. También están implicados en la regulación del ciclo reproductor de las hembras. Los progestágenos, esteroides C_{21} , regulan la maduración del ovocito y la espermiación.

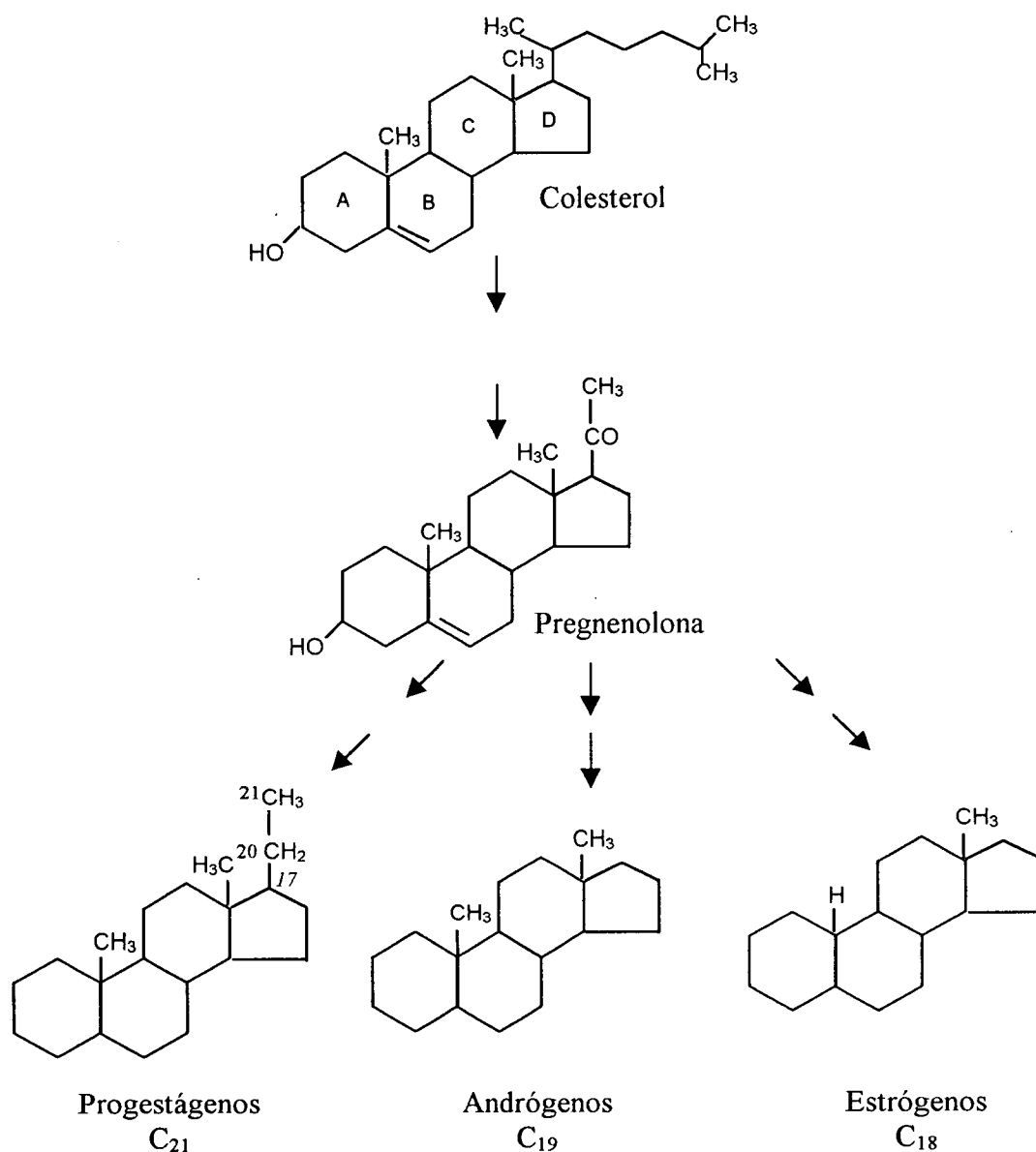
En los teleósteos, los andrógenos que generalmente se encuentran a mayor concentración en el plasma de los machos reproductores son la testosterona (T) y la 11-cetotestosterona (11-KT) (Borg, 1994). Ambos esteroides son sintetizados principalmente en el testículo. Numerosos estudios histoquímico-enzimáticos y de microscopía electrónica han revelado que las células de Leydig son la fuente principal de esteroides en el testículo (Yoshikuni y Nagahama, 1991).

El ovario de los teleósteos produce estradiol, testosterona y progestágenos. Actualmente se cree que el principal sitio de producción de estradiol en el ovario son las células foliculares, siendo ambas capas (la de células de la teca y la de la granulosa) necesarias para la producción de estradiol bajo el estímulo de la gonadotropina (Esquema 3). Las células de la teca sintetizan testosterona que, en respuesta a la estimulación por las gonadotropinas, es aromatizada a estradiol en las células de la granulosa (Adachi *et al.*, 1990). Este modelo de dos células, válido para los salmónidos, no parece cumplirse en otras especies de teleósteos, como *Fundulus heteroclitus* u *Oryzias latipes*, donde aparentemente no existe una capa de células de la teca, siendo las propias células de la granulosa las que sintetizan estradiol, sin necesidad de la intervención de otro tipo celular (Petrino *et al.*, 1989).

El ovario de los peces produce cantidades significativas de andrógenos, siendo la testosterona el principal andrógeno circulante. El otro andrógeno relevante en peces, la 11-KT, no está presente en hembras de ciprínidos y salmónidos, si bien en otras familias de



teleósteos se ha descrito una importante presencia de esta hormona en el plasma de las hembras (Lokman *et al.*, 2002).



Esquema 2. Estructura básica del colesterol y de los principales esteroides sexuales.

Un análisis general de la formación de progestágenos por el ovario de los peces se presenta en el apartado 1.4.2. de la presente Memoria.

En la mayoría de los vertebrados, los esteroides sexuales son transportados en la circulación sanguínea de forma libre o bien unidos a proteínas. Éstas pueden ser proteínas de baja especificidad y alta capacidad, como la albúmina; o proteínas de menor capacidad pero que unen esteroides sexuales de manera muy específica (*sex steroid binding proteins*, SSBPs) (Siiteri *et al.*, 1982). Las SSBPs son proteínas que han sido identificadas en el plasma de numerosas especies de teleósteos (Fostier y Breton 1975; Lazier *et al.*, 1985; Pasmanik y Callard 1986; Laidley y Thomas 1994) donde, además de proteger a los esteroides circulantes de una rápida degradación metabólica (Plymate *et al.*, 1990), regulan la disponibilidad de dichos esteroides en los tejidos diana (Pardridge, 1981).

En relación con el metabolismo de esteroides en peces, al igual que sucede en los mamíferos, los esteroides son metabolizados en el hígado, proceso tras el cual pueden pasar a la orina o ser acumulados en la vesícula biliar para su posterior excreción en las heces (Smith, 1973). En el hígado experimentan reacciones de sulfatación y glucuronación, que consisten en la conjugación de grupos hidroxilo del esteroide con grupos sulfatos o glucurónidos. En los peces, a diferencia de lo que sucede en los mamíferos, estas reacciones de conjugación no sólo tienen lugar en el hígado. En cultivos *in vitro* se ha observado que tejidos como las gónadas y las branquias tienen capacidad para convertir el esteroide libre en sus derivados conjugados (Kime, 1993; Kime y Ebrahimi, 1997). Desconocemos si estos derivados poseen un papel hormonal por sí mismos, si bien en algunos casos se ha sugerido que la transformación de la forma libre a la forma conjugada puede deberse simplemente a un proceso rápido de inactivación de la hormona (Inbaraj *et al.*, 1997). No obstante, el papel feromonal de esteroides glucuronados y sulfatados se ha puesto de manifiesto en numerosas especies de teleósteos (Moore y Scott, 1992; Sorensen *et al.*, 1995).

1.4. Control endocrino del desarrollo gonadal

1.4.1. Espermatogénesis.

Numerosos estudios realizados en las dos últimas décadas han demostrado que la espermatogénesis en los teleósteos está bajo el control de las gonadotropinas hipofisarias (rev. Patiño *et al.*, 2001). Concretamente, estudios realizados con cultivos de fragmentos testiculares de *Anguilla japonica* han permitido hallar evidencias sobre el papel que desempeñan las gonadotropinas y los andrógenos en el control de la espermatogénesis. La

gonadotropina coriónica humana (HCG) añadida al medio de cultivo induce la espermatogénesis en fragmentos testiculares cultivados durante 24 días. Tanto las células de Sertoli como las de Leydig responden a la HCG estimulando la síntesis de 11-KT (Miura *et al.*, 1991a). Además, la adición de 11-KT es suficiente para estimular todos los estados de espermatogénesis y espermiogénesis en cultivos de fragmentos testiculares. A partir de éstos, y otros resultados adicionales, se ha trazado un modelo de regulación en los peces en el que las gonadotropinas estimulan la producción de 11-KT por las células de Leydig, y esta hormona activa, vía células de Sertoli, la estimulación de las espermatogonias premitóticas y el proceso de espermatogénesis.

Los andrógenos desempeñan un doble papel en el control endocrino de la reproducción, regulando tanto la espermatogénesis como la espermiogénesis. Las elevadas concentraciones de andrógenos durante la espermatogénesis, y su rápido descenso tras la espermiación (Ueda *et al.*, 1983) sugiere una regulación por andrógenos tanto de la espermiogénesis como de la liberación del esperma de los cistos testiculares (Billard *et al.*, 1982; Fostier *et al.*, 1983; Nagahama, 1983).

Durante el proceso de la espermiación se han observado altas concentraciones plasmáticas de $17\alpha,20\beta$ -dihidroxi-4-pregnen-3-ona ($17,20\beta$ -P) en varios teleósteos (Scott y Baynes, 1982). En salmónidos, la administración de gonadotropina induce la espermiación junto con un aumento en la concentración plasmática de $17,20\beta$ -P. Igualmente se induce la espermiación tras inyectar directamente la $17,20\beta$ -P, aunque en este caso la magnitud de la respuesta es menor (Yueh y Chang, 1997). Hay, por tanto, importantes pruebas que sugieren que la $17,20\beta$ -P es el mediador de la acción inductora de la gonadotropina en la espermiación.

La adquisición de la movilidad de los espermatozoides también está regulada por las gonadotropinas. Aunque los espermatozoides que se encuentran dentro de los túbulos han completado las dos divisiones meióticas, son inmóviles y carecen de la capacidad de fecundar, la movilidad la adquieren en el conducto espermático. En esta fase de maduración del esperma las gonadotropinas estimulan la producción de la 17α -hidroxiprogesterona en el testículo (Sakai *et al.*, 1989). Esta hormona podría actuar como sustrato que los espermatozoides emplean para la producción de la $17,20\beta$ -P (Loir, 1990), reacción catalizada por la 20β -HSD.

1.4.2. Ovogénesis y maduración del folículo ovárico

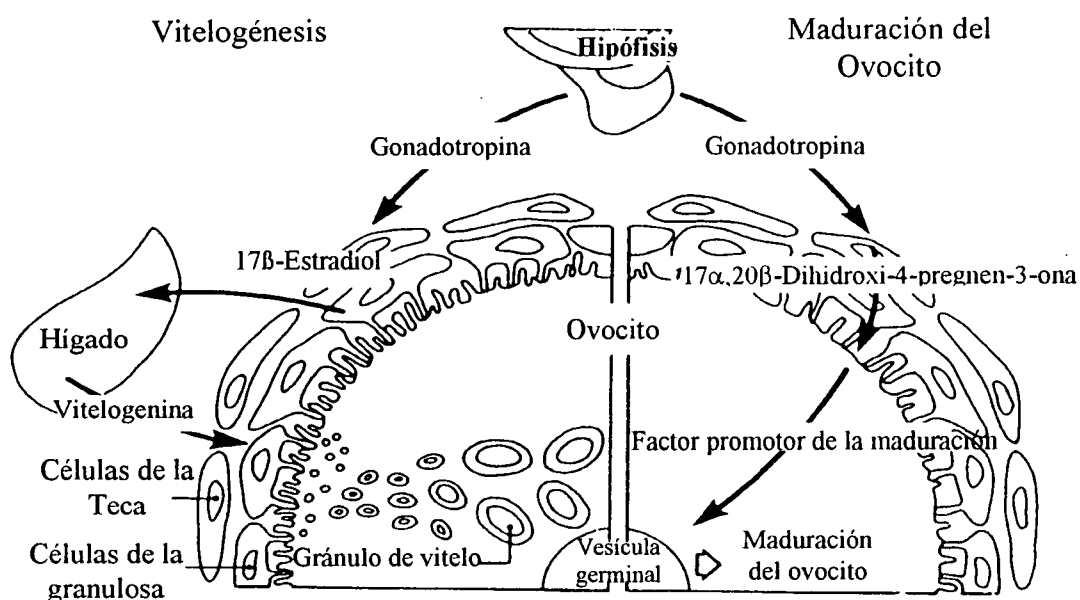
La fase de crecimiento primario del ovocito parece ser independiente de las hormonas reproductoras. Su crecimiento probablemente esté modulado por otros factores, como la disponibilidad de nutrientes, la tasa metabólica y hormonas metabólicas (Scott, 1987). La vitelogénesis sí es dependiente de las gonadotropinas hipofisarias y, en los peces teleósteos es estimulada por un mecanismo de dos etapas (Esquema 3). En la primera de ellas, la GtH-I aumenta la secreción ovárica de testosterona y 17β -estradiol (Pankhurst y Carragher, 1991), que sale a la circulación general estimulando tanto la síntesis como la secreción hepática de vitelogenina (Wallace, 1985). En una segunda etapa las gonadotropinas actúan junto al estradiol para estimular la incorporación de la vitelogenina al ovocito en desarrollo (Tyler, 1991). Numerosos estudios apoyan este modelo de regulación de la vitelogénesis demostrando que los niveles plasmáticos de estradiol en los teleósteos aumentan muy significativamente durante la vitelogénesis y disminuyen rápidamente antes de la maduración del ovocito (rev. Nagahama, 1994).

El control endocrino de la maduración del ovocito en los peces se ha de plantear dentro del contexto de cambios que suceden tanto en el propio ovocito como en las células foliculares que lo rodean. De este modo, en la actualidad se considera que está mediado principalmente por tres hormonas/factores: la GtH-II, la hormona inductora de la maduración (MIH) y el factor promotor de la maduración (MPF), que actúan de manera secuencial, y respectivamente, sobre las células foliculares, la membrana plasmática del ovocito y el citoplasma del ovocito (Esquema 3) (Nagahama, 1997). El incremento periovulatorio de la GtH-II es la primera señal endocrina responsable del reinicio de la meiosis, junto con el comienzo de la migración de la vesícula germinal. Esta hormona estimula en las células foliculares la producción de la MIH. Ciertos estudios sugieren que la GtH-II, además de estimular la producción folicular de MIH, también induce el desarrollo de la sensibilidad del ovocito a esta hormona. No obstante, los mecanismos que subyacen a este aumento en la sensibilidad a la MIH aún resultan muy especulativos (rev. Patiño *et al.*, 2001). La hormona inductora de la maduración actúa, a su vez, sobre receptores específicos situados en la membrana plasmática del ovocito (Patiño *et al.*, 2001), desencadenando la formación del factor promotor de la maduración que, en última instancia, sería el responsable directo del inicio del proceso de maduración (Nagahama, 1997).

En relación con las investigaciones dirigidas a la búsqueda de la hormona inductora

de la maduración en los peces, estudios *in vitro* han revelado que esteroides de 21 átomos de carbono (C_{21}) (Nagahama *et al.*, 1983; Canario y Scott, 1988; Trant y Thomas, 1988), entre los que se encuentran la progesterona, la 17α -hidroxiprogesterona, la $17,20\beta$ -P, $17,20\beta,21$ -trihidroxi-4-pregnen-3-ona ($17,20\beta,21$ -P), el cortisol y la deoxicorticosterona, inducen la maduración final del ovocito. La testosterona, así como otros esteroides de 19 átomos de carbono (C_{19}), son asimismo efectivos induciendo la maduración, pero a concentraciones muy superiores. El estradiol y otros esteroides de 18 átomos de carbono (C_{18}), no son efectivos en la inducción de la maduración, al menos en las especies estudiadas (Nagahama, 1994). En definitiva, numerosos trabajos han puesto de manifiesto que la $17,20\beta$ -P es el esteroide que, de manera más eficaz, induce la maduración de los ovocitos *in vitro* en varias especies de teleósteos (Nagahama *et al.*, 1983; Scott y Canario, 1987).

La primera vez que se aisló la MIH ($17,20\beta$ -P) en un vertebrado fue en el salmónido *Oncorhynchus rhodurus*, a partir del medio de cultivo en el cual ovocitos que habían completado la vitelogénesis fueron incubados en presencia de gonadotropinas (Nagahama y Adachi, 1985). Los niveles plasmáticos de $17\alpha,20\beta$ -P son muy bajos en ejemplares de *O. rhodurus* vitelogénicos, pero aumentan de manera aguda en hembras maduras y ovulantes (Young *et al.*, 1983). En base a estos resultados, Nagahama (1987)

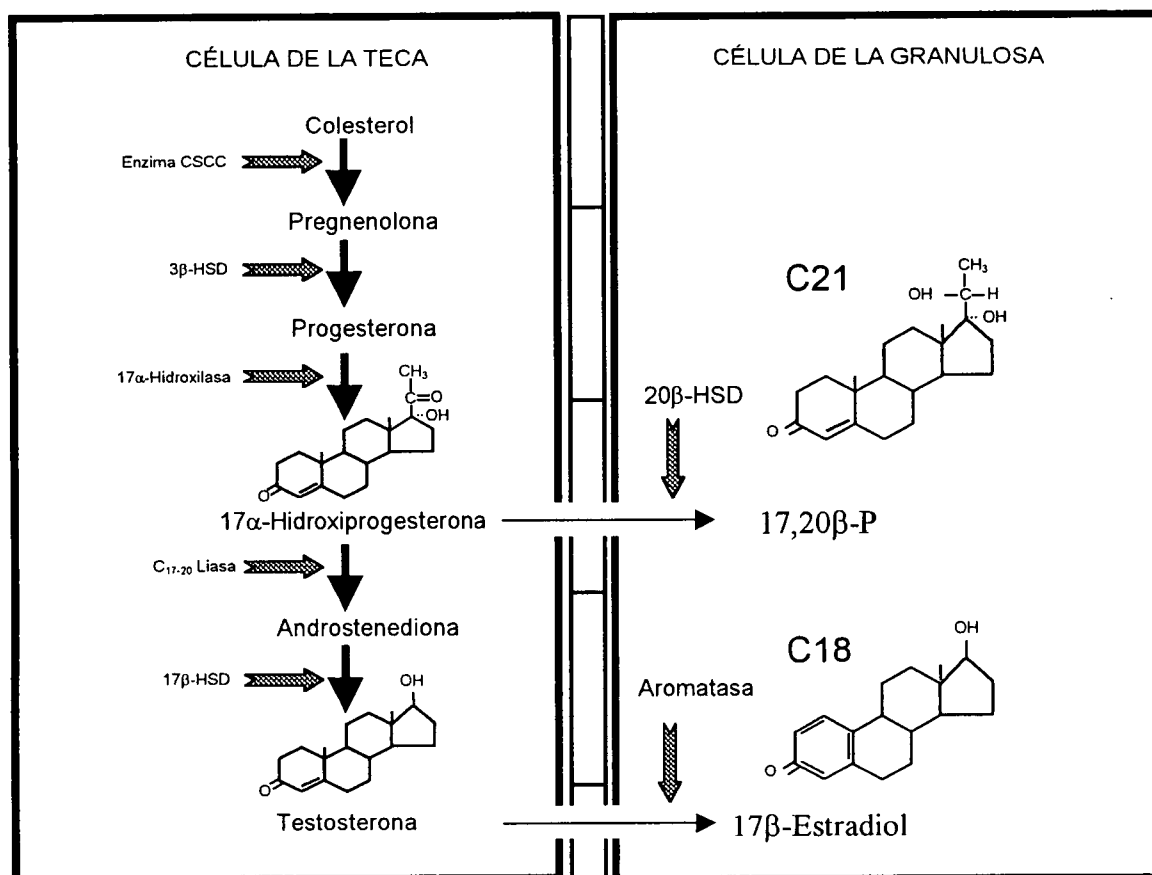


Esquema 3. Modelo propuesto para la regulación endocrina de la vitelogénesis y la maduración del folículo ovárico en salmónidos. (Modificado de Yoshikuni y Nagahama, 1991).

concluye que el esteroide 17,20 β -P es la MIH en este salmónido. Aunque se ha descrito que esta hormona es la MIH en numerosas especies de teleósteos, en ciertas especies, como por ejemplo en *Limanda limanda* y en *Pleuronectes plateas*, no se han encontrado niveles altos de esta hormona en hembras maduras o cercanas a la ovulación (Canario y Scott, 1990). Alternativamente, la 17,20 β ,21-P, otro esteroide C₂₁, ha sido identificado como la MIH en *Micropogonias undulatus* (Trant y Thomas, 1989), *Cynoscion nebulosus* (Thomas, 1994) y *Halobatrachus didactylus* (Modesto y Canario, 2002), donde interviene como el inductor más potente de la maduración del ovocito *in vitro*.

La producción de la MIH en salmónidos obedece a un modelo de dos células, similar al de la producción de 17 β -estradiol en las capas foliculares del ovocito durante la vitelogénesis. De acuerdo con este modelo (Esquema 4), las etapas primeras de la esteroidogénesis culminan con la formación de 17 α -hidroxiprogesterona en las células de la teca. Este esteroide difunde a través de la lámina basal pasando a las células de la granulosa, donde es transformado en 17,20 β -P por la 20 β -hidroxiprogesterona deshidrogenasa (20 β -HSD) (Young *et al.*, 1986). Las gonadotropinas, como desencadenantes de este proceso, se unen a receptores de membrana acoplados a adenilato ciclasa en las células de la teca, el incremento de AMPc resultante estimula la actividad de la citocromo P450, que cataliza la primera de las etapas de la ruta biosintética, el paso de colesterol a pregnenolona. En las células de la granulosa las gonadotropinas estimulan la *síntesis de novo* de la 20 β -HSD (Nagahama, 1997).

En la mayoría de los peces estudiados hasta la fecha se ha establecido claramente que en el momento de la maduración del folículo ovárico y la ovulación se produce un cambio en la esteroidogénesis gonadal, la producción de esteroides C₁₈ y C₁₉ (estradiol y testosterona) es reemplazada por la síntesis de esteroides C₂₁, principalmente 17,20 β -P (Scott *et al.*, 1983; Stacey *et al.*, 1983; Ueda *et al.*, 1984; Santos *et al.*, 1986; Kobayashi *et al.*, 1987; Canario y Scott, 1989). Este cambio está asociado, en parte, a una reducción de la actividad aromatasa en los folículos postvitelogénicos (Kanamori *et al.*, 1988), además de a una disminución en las actividades C₁₇₋₂₀ liasa (que cataliza la transformación de 17 α -hidroxiprogesterona en androstenediona) y/o 17 β -hidroxi esteroide deshidrogenasa (17 β -HSD) (que cataliza la conversión de androstenediona en testosterona), junto a un incremento en la síntesis de la enzima 20 β -HSD (Yoshikuni y Nagahama, 1991).



Esquema 4. Modelo propuesto para la síntesis de estradiol y 17,20β-P en ovocitos vitelogénicos y postvitelogénicos de salmónidos (Modificado de Yoshikuni y Nagahama, 1991).

A diferencia del patrón convencional en el que los esteroides se unen a receptores intracelulares, citosólicos o nucleares, la MIH se une a receptores de la membrana del ovocito (Yoshikuni *et al.*, 1993), que han sido caracterizados con detalle en *Seriola quinqueradiata* (Rahman *et al.*, 2002). La aparición de los receptores específicos para esta hormona es una etapa clave en el proceso de la maduración, habiéndose demostrado que ovocitos con el máximo grado de crecimiento, pero en etapas tempranas de maduración son insensibles a la MIH, siendo las gonadotropinas el activador principal de la síntesis de estos receptores, lo que confiere al ovocito un estado de “competencia” frente a la MIH (Thomas *et al.*, 2002). En este sentido, se ha descrito que la densidad de los sitios de unión a MIH muestra cambios relacionados con el proceso de desarrollo del ovocito, siendo mayor durante la maduración del ovocito y menor durante los estadios anteriores (Patiño y Thomas, 1990).

Este hecho de que la MIH actúe sobre la membrana del ovocito llevó a plantear la

existencia de un factor citoplasmático que mediara la acción de esta hormona. Este factor promotor de la maduración, que en peces se aisló por primera vez en huevos de carpa sin fecundar, es un complejo formado por dos componentes proteicos, una quinasa (cdc2-quinasa) y una ciclina (ciclina B) (Yamashita *et al.*, 1992). Uno de los mecanismos de acción propuestos para la MIH es la estimulación de la síntesis *de novo* de ciclina B, que fosforila y activa la cdc2quinasa preexistente (Yamashita 1998).

Este MPF está presente tanto en células meióticas como mitóticas, y no es específico de especie, habiéndose detectado en múltiples especies desde levaduras hasta mamíferos (Kishimoto, 1988). Estudios posteriores señalan que el MPF no es meramente un factor que promueve la maduración del ovocito en los peces, sino que se trata de un factor más general implicado en la regulación del ciclo celular (Nagahama, 1997).

En todas las especies de peces estudiados se ha observado que las prostaglandinas (PG) inducen la ovulación (Scott, 1987), habiéndose descrito una especificidad de especie en la respuesta a distintas PG (Goetz *et al.*, 1987). La ovulación está asociada a una alteración de la pared folicular que conduce a la formación de un sitio de ruptura a través del cual el huevo emergerá. Las PG, junto con la 17,20 β -P aumentan la actividad de enzimas proteolíticas producidas por los folículos ováricos del carpín (Berndtson y Goetz, 1987). Además, un incremento de la concentración de calcio intracelular favorecería la contracción de las fibras de músculo liso localizadas en la capa de las células de la teca, favoreciendo la liberación del huevo (Goetz *et al.*, 1987).

La puesta de los huevos normalmente requiere la presencia del macho, un sustrato adecuado (por ejemplo, vegetación en el carpín, grava en la trucha) y unas condiciones ambientales apropiadas. En el carpín la oviposición ocurre casi inmediatamente tras la ovulación, aparentemente desencadenada por la presencia de los huevos en el lumen ovárico. Probablemente las PG producidas en el ovario tras la ovulación favorecen el desove (Stacey *et al.*, 2001).

1.5. Feromonas sexuales y comunicación intraespecífica en la reproducción

1.5.1. Definición de feromona y papel de las feromonas sexuales

Las feromonas se definieron por primera vez como sustancias secretadas al exterior por un organismo y que son detectadas por un segundo individuo de la misma especie, en

el cual inducen una reacción específica (Karlson y Lüscher, 1959). Estos mismos autores apuntaron que las feromonas servían para la comunicación entre individuos, de esta manera el término feromona se usa a menudo como sinónimo de comunicación química inter- e intraespecífica.

Ya en el año 1956, Tavolga demostró que sustancias procedentes de peces sexualmente maduros podían modificar el comportamiento en individuos del sexo opuesto, sugiriendo que este efecto comportamental estaba mediado por el olfato. Desde entonces, numerosos estudios han mostrado que peces maduros son atraídos hacia el agua que contiene sustancias olorosas originadas por el sexo opuesto de la misma especie (Ostroumov, 1997; Yambe *et al.*, 1999).

En la actualidad está ampliamente aceptado que las feromonas desempeñan un papel clave en la reproducción de los peces. En muchas especies de teleósteos se ha demostrado que las feromonas provocan cambios en la tasa de desarrollo gonadal, inducen la ovulación y la espermiación, sincronizan la conducta de cortejo y otros cambios comportamentales asociados al desove. Así mismo, se ha sugerido que actúan como mediadores en las interacciones parentales (Stacey y Sorensen, 1991; Sorensen y Wyatt, 2000). Por tanto, el estudio del sistema feromonal constituye en la actualidad un elemento clave para lograr un conocimiento completo de la regulación endocrina y ambiental de la reproducción en los peces.

1.5.2. Tipos y naturaleza química de las feromonas

Las feromonas sexuales se clasificaron por Wilson y Bossert en 1963 en función de la respuesta que suscitaban en el organismo que captaba la señal olfatoria. Así pues, las feromonas primarias, modificadoras o “primer” inducen e inician en el animal receptor una cadena de alteraciones fisiológicas a largo plazo e irreversibles. De forma complementaria, las feromonas inductoras o “releaser” provocan cambios inmediatos en la conducta del animal receptor.

El hecho de que se identificaran como feromonas a un conjugado glucurónido de la eticolanolona procedente del testículo de *Gobius jozo* (Colombo *et al.*, 1982), y a conjugados glucurónidos de testosterona y 17 β -estradiol procedentes del ovario de *Brachydanio rerio* (Van Den Hurk *et al.*, 1987), estimuló la investigación del posible papel de las hormonas gonadales y sus metabolitos como feromonas en los peces. De hecho, numerosos estudios realizados en los últimos años han demostrado que la mayoría de las

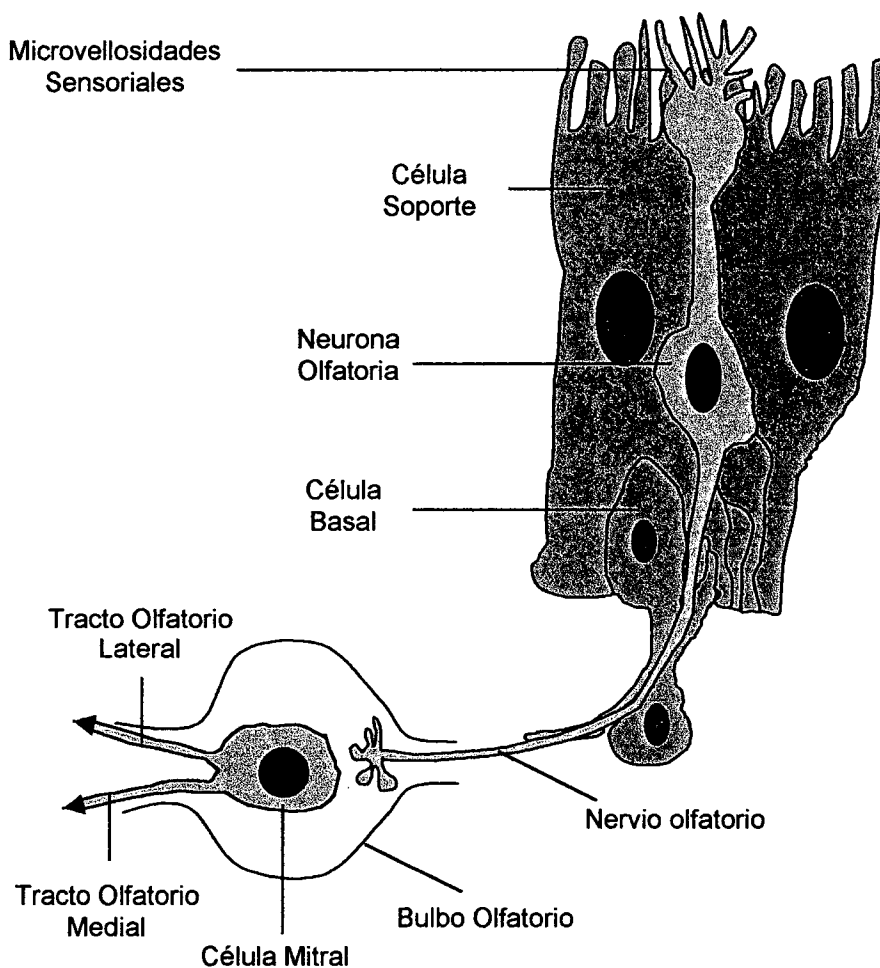
feromonas sexuales identificadas en los peces son de naturaleza esteroide, principalmente del tipo C₂₁, y prostaglandinas (Sorensen y Caprio, 1998; Sorensen y Stacey, 1999; Murphy *et al.*, 2001).

La información básica requerida para comprender las funciones de cualquier feromona hormonal incluye varios aspectos, desde el estudio de las rutas biosintéticas y las posibles vías de liberación hasta el análisis de la sensibilidad y especificidad de la detección olfatoria, así como los mecanismos de respuesta. De entre estos aspectos, la síntesis y liberación al agua de distintas feromonas hormonales se ha investigado en varias especies de teleósteos, *Carassius auratus* (Dulka *et al.*, 1987), *Brachydanio rerio* (Van Den Hurk *et al.*, 1987), *Clarias gariepinus* (Van Weerd *et al.*, 1991) y *Trichogaster trichopterus* (Becker *et al.*, 1992).

1.5.3. Órgano olfatorio en los peces

Dicho órgano muestra una gran diversidad en los peces, concretamente en los teleósteos en la parte dorsal de la cabeza se localizan dos orificios nasales que comunican con dos cavidades revestidas de la superficie olfatoria denominada epitelio o mucosa olfatoria, que se repliega en lamelas formando la roseta olfatoria. El grado de desarrollo y la forma de estas lamelas varía considerablemente de unas especies a otras. El epitelio olfatorio se divide en epitelio no sensorial y sensorial, y en éste último se identifican tres tipos celulares, células sensoriales (receptoras o neuronas olfatorias), células de sostén y células basales (Esquema 5). Las neuronas olfatorias, a diferencia del resto de las neuronas del sistema nervioso de los vertebrados, son las únicas neuronas cuyos axones llevan información desde el exterior directamente al cerebro, y además, se renuevan cada pocas semanas. Son neuronas sensoriales bipolares con el pericarion situado en el epitelio olfatorio, una dendrita estrecha se extiende desde el pericarion hasta la superficie epitelial recubierta de mucus, terminando en una protuberancia que se proyecta al interior de la capa mucosa (secretada por células de sostén y glándulas subyacentes). De esta protuberancia parten microvellosidades o cilios olfatorios que se extienden como una red en la capa mucosa, y en cuyas membranas se localizan las moléculas receptoras capaces de reconocer y transducir las señales olfatorias. Datos recientes sugieren que los cilios estarían mediando la recepción de sustancias olorosas procedentes del alimento, mientras que las neuronas que poseen micovellosidades detectarían feromonas (Sorensen y Caprio, 1998). Las células de sostén además de ofrecer un soporte mecánico y tener propiedades

secretoras, parecen desempeñar un papel de inactivación de las moléculas olorosas cuando éstas se disocian de los receptores olfatorios. Las células basales son células indiferenciadas progenitoras de los otros dos tipos celulares. El epitelio olfatorio no sensorial está constituido por células epidérmicas, células basales y células mucosas.



Esquema 5. Modelo esquemático del epitelio sensitivo olfatorio mostrando los distintos componentes y sus conexiones con el sistema nervioso central.

Los axones de las neuronas olfatorias son finos y amielínicos y cruzan la membrana basal agrupándose en la submucosa para formar el nervio olfatorio, que alcanza el bulbo olfatorio donde sinapta con las células bulbares de segundo orden o células mitrales (Esquema 5). Las células mitrales forman el tracto olfatorio a través del cual la información del bulbo es conducida a los hemisferios telencefálicos. El tracto olfatorio está constituido por dos haces, el tracto olfatorio lateral y el medial. La información olfatoria que surge desde el bulbo olfatorio se transmite a través de estos dos canales, el lateral y el

medial, siendo dirigida a distintas localizaciones del telencéfalo y del diencéfalo. En el carpín, la sección del tracto olfatorio medial reduce la conducta de cortejo, mientras que la respuesta ante un olor alimentario se ve más reducida por la sección del tracto olfatorio lateral que la del medial (rev. Hara, 1994).

1.5.4. Detección olfatoria: Registro electro-olfatograma

El electro-olfatograma (EOG) es un registro del potencial eléctrico negativo en la superficie del epitelio olfatorio de los vertebrados. Este potencial representa la suma de los potenciales generadores desencadenados tras la unión de las sustancias olorosas a los receptores de las neuronas olfatorias. Estos receptores actúan a través de segundos mensajeros que provocan la apertura de canales iónicos generando la despolarización de la membrana. El EOG representa la actividad en una población de células, pero el número exacto de las células que participan en la respuesta resulta difícil de estimar (rev. Scott y Scott-Johnson, 2002).

Las técnicas de electro-olfatograma (EOG) han permitido valorar la sensibilidad y la especificidad olfatoria a numerosas feromonas hormonales y sus metabolitos. Además, los experimentos de adaptación cruzada nos permiten averiguar si varias sustancias actúan a través del mismo o distinto receptor olfatorio. Por ejemplo, si la exposición a un odorante A conduce a una reducción en la respuesta a sucesivas exposiciones de A, así como de otra sustancia B, pero no a la molécula C; entonces podemos concluir que A y B actúan a través del mismo receptor, mientras que la sustancia C lo hace a través de otra(s) población(es) de receptores diferentes (rev. Hara, 1994).

En la mayoría de las especies de teleósteos estudiadas se ha hallado sensibilidad olfatoria a alguna de las hormonas que son liberadas al agua en el momento de la maduración del ovocito. El hecho de que obtengamos una respuesta positiva a un compuesto que un individuo está secretando al agua, no indica necesariamente que dicho compuesto sea una feromona, aún queda por demostrar si estas hormonas y/o sus metabolitos son capaces de desencadenar una respuesta en el individuo.

1.5.5. Sistema feromonal en ciprínidos

El sistema feromonal más estudiado en teleósteos es el del carpín, única especie de teleósteo en la que se ha descrito la producción, liberación y detección olfatoria de feromonas hormonales, así como las respuestas fisiológicas y comportamentales que éstas

desencadenan (Sorensen y Stacey 1999). Las hembras de carpín ovulan en primavera como respuesta a un aumento de la GtH-II desencadenado por razones variadas, como por ejemplo, el incremento de temperatura ambiental, el crecimiento de un sustrato adecuado de vegetación acuática y/o la liberación de feromonas al agua. Teniendo en cuenta la dificultad para la comunicación visual en el momento de la oviposición, que se realiza en aguas turbias y al amanecer, una comunicación feromonal entre sexos opuestos resulta esencial para la sincronización de la actividad reproductora. Las hembras ovulatorias de carpín liberan una mezcla de 17,20 β -P libre y sulfatado y AD, cuya proporción varía a lo largo del ciclo reproductor. El conjugado sulfatado de la 17,20 β -P estimula la concentración plasmática de GtH-II, mientras que la AD inhibe la conducta de cortejo evitando de esta manera interacciones reproductivas cuando la hembra no se muestra receptiva, y conservando la potencialidad reproductora para el momento en que la puesta tenga lugar (Poling *et al.*, 2001). La 17,20 β -P liberada por las hembras a través de las branquias durante el ciclo ovulatorio (Sorensen *et al.*, 2000) induce un aumento del volumen del esperma en los machos. Este esteroide se asocia a un receptor de membrana del epitelio olfatorio del carpín (Roseblum *et al.*, 1991) desencadenando una secuencia de eventos que incluye un aumento de la actividad aferente neural en el tracto olfatorio medial (Sorensen *et al.*, 1991) y una reducción de la tasa de recambio de DA hipofisaria (Dulka *et al.*, 1992), lo que induce un rápido aumento en los niveles plasmáticos de GtH-II que en último término provoca el aumento en el volumen del esperma (Stacey *et al.*, 1989). Además, estimula la conducta sexual, aumentando la competitividad entre los machos (De Fraipont y Sorensen, 1993; Zheng *et al.*, 1997). La feromona postovulatoria liberada por las hembras inmediatamente tras la ovulación, compuesta de una mezcla de prostaglandinas, prostaglandin F_{2 α} (PGF_{2 α}) y 15-keto PGF_{2 α} , estimula la concentración plasmática de GtH-II y el volumen espermático, y atrae a los machos hacia las hembras (Sorensen y Stacey, 1999).

En otras especies de teleósteos el nivel de conocimiento del sistema feromonal es muy limitado, y en muchas ocasiones inexistente.

2. Objetivos generales

La motivación general que nos ha llevado a realizar el presente trabajo ha sido investigar ciertos aspectos desconocidos hasta la fecha en relación con la endocrinología reproductora de la tenca (*Tinca tinca*). La tenca, especie autóctona de la región Eurosiberiana donde su cultivo se viene desarrollando desde la Edad Media, es en la actualidad uno de los ciprínidos de mayor interés económico en toda Europa, concretamente en España su cultivo ha experimentado un notable incremento en la última década. Uno de los retos clave en el desarrollo del cultivo de peces es conseguir que la especie cultivada complete en cautividad todas las etapas de su ciclo vital, incluyendo la reproducción. Sin embargo, en la tenca existe un desconocimiento importante de aspectos básicos de su endocrinología reproductora, por lo que su estudio constituye un requisito clave para el desarrollo del cultivo de esta especie.

Nuestro objetivo global de investigar la endocrinología reproductora de esta especie se ha concretado en los siguientes objetivos:

- En primer lugar nos propusimos caracterizar el ciclo reproductor anual en la tenca condiciones naturales de fotoperíodo y temperatura, determinando las variaciones estacionales tanto en las concentraciones plasmáticas de los principales esteroides sexuales, como en la morfología gonadal en ambos sexos.

- Una vez conocido el patrón reproductor en esta especie, nos planteamos investigar si la tenca, al igual que se ha descrito en otros peces, es capaz de liberar esteroides sexuales al agua. Tanto el tipo de esteroide, como las cantidades liberadas, representan una información muy valiosa del estado reproductor del pez, y además se obtiene con facilidad sin necesidad de una manipulación invasiva de los animales. Con esta aproximación metodológica pretendemos profundizar en el conocimiento de los cambios endocrinos asociados al proceso de maduración final del ovocito. Este objetivo no sólo se desarrolló en la tenca, sino que además se aplicó a otras dos especies de teleósteos, el salmónido *Salvelinus fontinalis* y el ciprínido *Brachydanio aequipinnatus*, con el ánimo de obtener perfiles comparados de tipos y cantidades relativas de esteroides sexuales liberados al agua en torno a la oviposición de distintas especies.

- A partir de la información obtenida con el desarrollo del objetivo anterior surge una cuestión inmediata, ¿son los peces capaces de detectar estas hormonas liberadas al agua por ellos mismos y sus congéneres? En caso afirmativo, esta información “ambiental” permitiría la comunicación entre individuos que podría utilizarse, entre otros fines, para sincronizar sus ciclos reproductores optimizando un ajuste temporal de procesos clave

como son la ovulación y la liberación del esperma. Mediante el registro de la actividad olfatoria, utilizando una técnica electrofisiológica, el olfatograma, nos propusimos averiguar cuáles de los esteroides liberados al agua por las tencas hembras en el momento de la maduración, y a qué concentraciones, eran detectados por las tencas macho.

- Por último, y a partir de los resultados obtenidos en relación con la liberación de esteroides sexuales al agua en las distintas especies estudiadas, nos planteamos estudiar porqué la dinámica de liberación del plasma al agua no era igual para los distintos esteroides investigados. Con el fin de investigar si en este distinto comportamiento podrían estar interviniendo las proteínas plasmáticas transportadoras de esteroides sexuales, por ejemplo a través de cambios en su cinética de transporte de los diferentes esteroides, realizamos un estudio en profundidad en el que abordar el siguiente doble objetivo. Por un lado, determinar las características cinéticas de la unión de los esteroides sexuales a dichas proteínas circulantes en la tenca, y por otro, averiguar si los peces manifiestan una captación diferencial de los esteroides sexuales presentes en el agua.

3. Capítulo I

“Caracterización del ciclo reproductor estacional en el ciprínido *Tinca tinca*”

3.1. Objetivos y diseño experimental

La tenca (*Tinca tinca*), es un ciprínido autóctono de la región Eurosiberiana, donde su cultivo se viene realizando desde la Edad Media (Steffens, 1995). En la actualidad esta especie está despertando un gran interés en el campo de la acuicultura en España (Pérez-Regadera y Velasco Gemio, 1995), por lo que la optimización de su éxito reproductor es un elemento clave en la mejora de su cultivo.

Como en la mayoría de los teleósteos de las zonas templadas, la actividad reproductora de la tenca en su hábitat natural presenta un patrón estacional, que le permite sincronizar el desove con las condiciones ambientales y nutricionales óptimas. Esta sincronización del eje reproductor con el ambiente muestra un notable carácter adaptativo, al conseguir optimizar la supervivencia de la descendencia.

Los cambios estacionales que se producen en el tamaño gonadal y en la morfología del ovario han sido estudiados en poblaciones de tencas del Este de Europa (Epler *et al.*, 1981; Linhart y Billard, 1995; Pimpicka y Koryzno, 1995). Sin embargo, los trabajos relativos a la endocrinología reproductora de la tenca son muy escasos, y en ninguno de ellos se analizan las concentraciones plasmáticas de esteroides sexuales de importancia clave en la regulación endocrina de la reproducción, como son por ejemplo, la 11-cetotestosterona o los esteroides de 21 átomos de carbono responsables de la inducción de la maduración.

Así pues, teniendo en cuenta esta falta de información básica, nos planteamos como objetivo del presente trabajo, caracterizar el ciclo reproductor anual del ciprínido *Tinca tinca*, en condiciones naturales de fotoperíodo y temperatura, evaluando, además de los cambios estacionales en la morfología gonadal, las variaciones en las concentraciones plasmáticas de esteroides sexuales. Para ello, se utilizaron ejemplares adultos de ambos sexos, procedentes del “Centro de Acuicultura, Piscifactoría Vegas del Guadiana” (Badajoz) y de la piscifactoría “Ipescon” (Salamanca). Realizamos un muestreo en cada estación del año, excepto en el verano en que se efectuaron dos, ya que es en esta estación cuando se produce el desove en condiciones naturales.

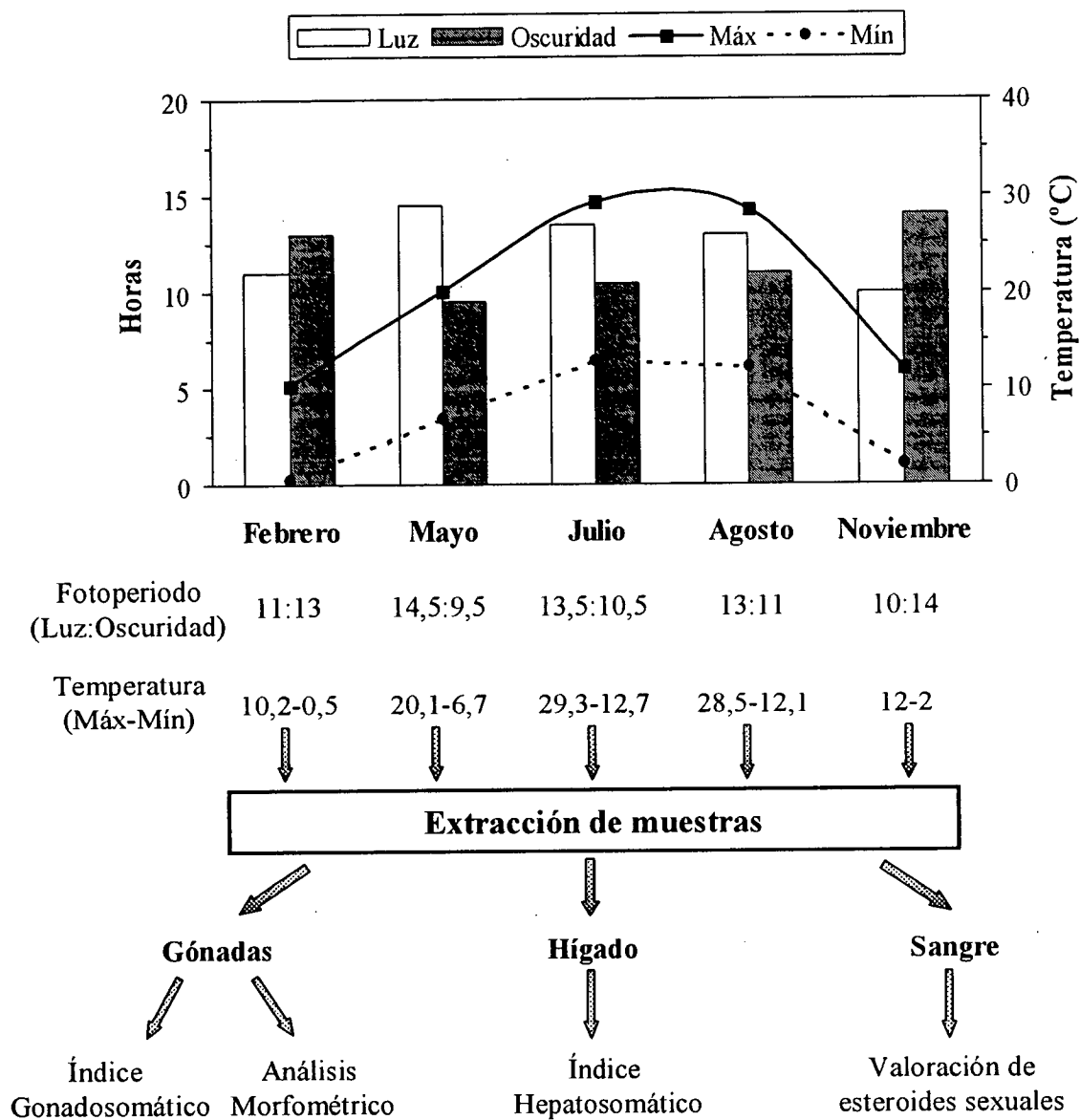
El estudio se realizó en ambos sexos. La tenca presenta un claro dimorfismo sexual, por lo que la identificación de los sexos se realiza de manera sencilla. Las aletas pélvicas en el macho se encuentran arqueadas, siendo, además, mucho más gruesas que en las hembras debido al engrosamiento que presenta el segundo radio (Esquema 6).



Esquema 6. Fotografía mostrando el dimorfismo sexual en la tenca. Detalle de las aletas pélvicas en machos (izquierda) y hembras (derecha).

Los peces se mantuvieron en Madrid en las dependencias de la Escuela de Ingenieros Agrónomos de la Universidad Politécnica, en tanques de 5.000 l. Una vez capturados, y tras ser pesados y medidos, se extraían muestras de sangre. Centrifugadas las muestras, el plasma se separaba y se congelaba en arcones a -80°C , donde se conservaba hasta la posterior determinación del contenido de esteroides sexuales. Inmediatamente después de la extracción de sangre los peces se sacrificaban por decapitación, y se procedía a la obtención y pesado de las gónadas y el hígado, con objeto de determinar los índices gonadosomático y hepático, respectivamente. Las gónadas se fijaron en solución de Bouin y fueron preparadas para el posterior análisis morfométrico realizado a microscopía óptica. Los distintos estados de maduración del folículo ovárico se estimaron según la clasificación utilizada por Pimpicka (1990). Del mismo modo, se establecieron una serie de categorías para la determinación del grado de desarrollo testicular (Esquema 7). Para más detalles metodológicos véase el apartado de materiales y métodos del artículo presentado a continuación.

Los niveles circulantes de hormonas sexuales se determinaron mediante radioinmunoensayos específicos realizados tras un proceso de extracción previa de los esteroides del plasma (Scott et al., 1984; Moore et al., 2000). Los esteroides determinados fueron 17β -estradiol, testosterona, androstenediona, 11-cetotestosterona, $17,20\beta$ -dihidroxi-4-pregnen-3-ona, $17,20\alpha$ -dihidroxi-4-pregnen-3-ona y $17,20\beta,21$ -trihidroxi-4-pregnen-3-ona.



Esquema 7. Diseño experimental realizado para la caracterización del ciclo reproductor estacional en el ciprinido *Tinca tinca*.

3.2. Artículo 1

**“SEASONAL CHANGES IN PLASMA GONADAL STEROID
CONCENTRATIONS AND GONADAL MORPHOLOGY OF MALE AND
FEMALE TENCH (*Tinca tinca*, L.)”**

M. L. PINILLOS*† M.J. DELGADO† AND A. P. SCOTT*‡

**The Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science, Barrack Road, The
Nothe Weymouth, Dorset, DT4 8UB, U. K.*

*†Departamento de Fisiología (Fisiología Animal II), Facultad de Biología, Universidad
Complutense, 28040 Madrid. Spain*

‡Author for correspondence:

*M.J. Delgado, Departamento de Fisiología (Fisiología Animal II), Facultad de Biología,
Universidad Complutense, 28040 Madrid. Spain*

Phone: 34913944984; Fax: 34913944935; e-mail: mjdelgad@bio.ucm.es

Running title: Sex steroids and gonadal morphology in tench

PUBLICADO EN: *AQUACULTURE RESEARCH* (EN PRENSA, 2003)

ABSTRACT

In order to gain a better understanding of the reproductive cycles of male and female tench (*Tinca tinca*), gonadosomatic index, gonad histology and plasma concentrations of estradiol-17 β (E₂), testosterone, androstenedione, 11-ketotestosterone (11-KT), 17,20 β ,21-trihydroxy-4-pregnen-3-one (17,20 β ,21-P), 17,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (17,20 β -P) and 17,20 α -dihydroxy-4-pregnen-3-one (17,20 α -P) were measured at the four seasons of the year plus a further sampling coincident with the peak of spawning in early July. As expected, in both males and females, plasma concentration of androgens (excluding 11-KT in females – undetectable) and C₂₁ steroids were significantly more elevated in the spring and summer (when most gonadal development took place) than in the autumn and winter. The only unexpected finding was that 17,20 β -P and 17,20 β ,21-P, the steroids that are normally associated with oocyte final maturation in females and spermiation in males, were found in substantial amounts in both pre-vitellogenic, pre-spermatogenic and post-spawning fish. This suggests that these steroids may have other as yet unidentified roles in this species.

Key words: tench, seasonal reproduction; oogenesis, spermatogenesis, sex steroids.

INTRODUCTION

The tench (*Tinca tinca*, L.) is a multispawning cyprinid widely distributed in Europe, where a growing interest in its culture has been experienced in the recent years (Pérez-Regadera & Velasco-Gemio, 1995). The annual changes in ovarian histology in tench populations from Eastern Europe have been extensively studied (Epler, Bierniarz & Horoszewicz, 1981; Linhart & Billard, 1995; Pimpicka & Koryzno, 1995). However, very few studies have been published concerning the reproductive endocrinology of the tench. These studies report the effect of temperature on pituitary and plasma concentrations of gonadotropin (Breton, Horoszewicz, Bierniarz & Epler, 1980), annual changes in plasma concentrations of estradiol-17 β (E₂), testosterone, progesterone and oestrone in both males and females (Simontacchi, Ceccarelli, Lombardi & Minervini, 1984) and E₂ in females (Martin, Rebollar, San Juan, Illera & Alvarino, 1999). However, to our knowledge, there are no published data on plasma concentrations of relevant teleost sex steroids such as 11-ketotestosterone (11-KT) and 17,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (17,20 β -P).

Teleost oogenesis has been well-described (Scott, 1987; Tyler & Sumpter, 1996), and consists of primary oocyte growth that is independent of reproductive hormones, and secondary oocyte growth (vitellogenin accumulation) that is dependent on pituitary gonadotropins. Gonadotropin I stimulates the production of E₂ and testosterone by the follicular cells that surround the secondary oocytes (Pankhurst & Carragher, 1991), and then, the E₂ stimulates vitellogenin synthesis by the liver (Wallace, 1985). Testosterone stimulates the build up of gonadotropin II in the pituitary (Crim, Peter & Billard, 1981; Antonopoulou, Mayer, Borg, Swanson, Murza & Christoforov, 1999). This hormone is released in a surge just prior to spawning and induces the release of C₂₁ steroids by the follicular cells surrounding the secondary oocytes (Swanson, 1991). Two of these steroids, 17,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (17,20 β -P) (Scott & Canario, 1987) and 17,20 β ,21-

trihydroxy-4-pregnen-3-one (17,20 β ,21-P) (Trant & Thomas, 1989) are key hormones in triggering oocyte final maturation in teleosts.

Androgens in teleost fishes have been reviewed by Borg (1994). During spermatogenesis in most male teleosts, there is an increase in plasma testosterone and 11-ketotestosterone (11-KT) which play key regulatory roles as testicular mediators of gonadotropin-induced spermatogenesis and secondary sexual characteristics. At the end of spermatogenesis, in many but not all teleosts, there is a surge in the plasma concentrations of the same maturation inducing steroids that are found in females (Baynes & Scott, 1985). These steroids are believed to be involved in the control of testicular hydration and sperm motility (Miura, Kasugai, Nagahama & Yamauchi, 1995).

To date, seasonal changes in testicular histology and gonadal steroids in male tench are unknown. This lack of available information on the reproductive endocrinology in a species of increasingly applied interest prompted us to undertake the present study. We investigate the seasonal changes in gonadal histology and plasma concentrations of a variety of gonadal steroids in both sexes. As well as the classical hormones, E₂, testosterone, 11-KT, and the C₂₁ steroids (17,20 β -P and 17,20 β ,21-P), we also examine androstenedione (another potential androgen) and 17,20 α -dihydroxy-4-pregnen-3-one (17,20 α -P).

MATERIAL AND METHODS

FISH

Sexually mature tench (*Tinca tinca*, L) were supplied by "Ipescon" and "Centro de Acuicultura Las Vegas del Guadiana" fishfarm. Fish (females, 108.9 ± 2.9 g; males, 94.9 ± 2.4 g body weight) were captured during the four seasons of the year (spring, summer, autumn and winter) and at the beginning of July (coincident with the peak of the spawning season). The photoperiod and maximum-minimum mean water temperature for each sampling time were as follows: winter (February, 11L:13D, 10.2-0.5°C), spring (May, 14.5L:9.5D, 20.1-6.7°C), summer (13.5L:10.5D, 29.3-12.7°C in July and 28.5-12.1 in August) and autumn (November, 10L:14D, 12.0-2.0°C). Due to difficulties in sampling directly from the stock tanks, the tench used in this study were transferred to 5 m³ tanks with a continuous filtered freshwater supply under natural environmental conditions before being sampled three weeks later. Food consisted of a commercial pellet diet supplemented with rotifers and daphnia, except during winter when the fish do not normally feed.

For sampling, tench were weighed and measured, a blood sample was withdrawn by cardiac puncture into a heparinized syringe, and plasma was stored at -20°C until the assays were performed. Gonads were removed, weighed and the gonadosomatic index was calculated (GSI: gonad weight/body weight \times 100).

HISTOLOGY

The ovaries were fixed in Bouin's solution, embedded in paraffin and 4 μ m sections stained with Gomori's trichrome and examined by light microscopy. The oocyte maturation stages were estimated according to Pimpicka (1990). Thus, primary oocytes (i.e. those without any signs of cortical alveoli or yolk formation) are divided into two types, B1 and B2. Type B1 is a freshly formed oocyte with only a small amount of

cytoplasm. Type B2 is larger and contains a larger amount of clear cytoplasm. The oocytes showing cortical alveoli formation are also divided into two types: C (with one row of vacuoles) and D (with two rows of vacuoles). The oocytes containing yolk were classified as type E. The number of different types of oocytes in the ovaries was estimated by a stereological method (Emerson, Walker & Witthames, 1990), and the oocyte diameters were measured with the aid of an image analysis system attached to the microscope. Oocytes were only measured if the nucleus was present in the cross-section. The mean was taken of the longest and shortest axes.

Testis were fixed in a Bouin's solution, embedded in paraffin and 5 μm sections stained with haematoxylin and eosin, and examined by light microscopy. The testes were classified into five stages of development: *Stage I* - tubules contain spermatogonia and cysts of primary spermatocytes; *Stage II* - spermatogenesis is very active and there are cysts containing all stages of secondary spermatocytes and spermatids (but no spermatozoa in the lumen); *Stage III* - similar to stage II, but spermatozoa appearing in the lumen; *Stage IV* - the tubules are full of spermatozoa and secondary spermatocytes are absent; *Stage V* - the walls of the tubules mostly consist of spermatogonia and cysts of primary spermatocytes, but congealed spermatozoa are still present in the lumen.

GONADAL STEROID DETERMINATION

The circulating steroid concentrations were determined by radioimmunoassay (RIA) after extraction as previously described (Scott, MacKenzie & Stacey, 1984, Moore, Scott & Collins, 2000). Briefly, free steroids were extracted from 100 μl plasma by shaking with 4 ml of diethyl ether. After freezing the aqueous phase in liquid nitrogen, the organic phase was poured into a separate tube, and evaporated to dryness in a fume cupboard at 45°C. The dried extracts were solubilized in 1 ml assay buffer (0.05 M sodium

phosphate buffer, pH 7.6, containing 0.1% bovine serum albumin and 0.01% sodium azide). Duplicate aliquots (50 μ l) were assayed in the specific RIAs. In all the assays, the standard concentrations ranged from 500 to 4 pg per tube. The plasma extracts were assayed for E₂, testosterone, 11-KT, androstenedione, 17,20 α -P, 17,20 β -P and 17,20 β ,21-P. The specificity of the antibodies and more detailed information of the radioimmunoassays can be found in Scott *et al.* (1984) and Moore *et al.* (2000).

STATISTICS

Data were normalised by logarithmic transformation before analysis. An analysis of variance (ANOVA) was applied using the Statistical Analysis System (SAS). Differences between seasons were tested by the Tukey's test for multigroup comparisons. Data were expressed as mean \pm S.E.M. A probability level of $p < 0.05$ was considered as statistically significant.

RESULTS

Pronounced seasonal differences were found in GSI (Table I). In both sexes, the GSI increased significantly in spring - reaching its maximum value in July, when spawning took place. The GSI decline significantly after spawning and remained unchanged throughout autumn and winter.

Sections of ovary showed that primary oocytes (B_1 and B_2) were found in gonads at all seasons of the year. Figure 1 shows the changes in the numbers of secondary oocytes (upper graph) and in the oocyte diameter (lower graph) in the ovary of the tench throughout the year. After spawning, in August, the number of E stage oocytes was markedly lower than in July. Those that were present showed signs of degeneration. The numbers of C stage oocytes had not changed and there were no D stage oocytes. Moving into autumn, the number of C stage oocytes had significantly increased and D stage oocytes had reappeared. The latter increased significantly in winter. The number of C and D stage oocytes was the same in spring and winter. Numbers of both had fallen significantly by July concomitant with the appearance of yolky oocytes. Although large changes occurred in the numbers of stage C and D oocytes throughout the year, their average diameters (around 190 and 290 μm , respectively) did not change significantly.

The seasonal profile of E_2 , testosterone and androstenedione concentrations in plasma of female tench is shown in Figure 2. All these steroids exhibited significant variations throughout the year, with the highest values in spring-summer and the lowest during autumn-winter. The plasma E_2 concentrations in female tench were below the sensitivity limit of the assay (0.4 ng/ml) at three of the sampling times (winter, autumn and the beginning of July). Testosterone concentration was slightly higher than E_2 throughout the year, and showed a gradual rise during spring and summer and a significant fall after spawning. A pronounced annual pattern was also shown by androstenedione, reaching a

peak in fully mature fish. 11-KT was undetectable in any of the blood samples from female tench.

All of the three C_{21} steroids (17,20 β -P, 17,20 α -P and 17,20 β ,21-P) were measurable in female plasma throughout the year (Figure 3). A progressive and significant increase was observed from winter to spawning time. The most dramatic peak occurred in the concentrations of 17,20 β -P (around 6-fold). A significant decline was observed in all the C_{21} steroids during autumn and winter.

The testes of all the fish sampled in winter and autumn were at *Stage I* of development (i.e. spermatogonia and cysts of primary spermatocytes; Fig. 4). By the spring, this had changed to 60% *Stage II* (advanced spermatogenesis) and 40% *Stage III* (appearance of spermatozoa in the lumen). By the early summer, this had shifted to a mixture of *Stages III, IV and V*, and by mid-summer there were *Stage V* testes only, in which scant numbers of spermatozoa (which were probably being reabsorbed) could be observed in the lumen.

The annual profiles of 11-KT, testosterone and androstenedione in plasma of the male tench are shown in Figure 5. The 11-KT was below the detection limit of the assay (0.4 ng/ml) in winter and autumn. In spring it rose to 4.8 ng/ml, was significantly lower in July (2.1 ng/ml) and rose again in August. Mean testosterone concentrations were significantly higher during spring and summer than in winter and autumn. Androstenedione exhibited a similar seasonal pattern to testosterone, but its concentration in male plasma was approximately three times higher.

Concentrations of 17,20 β -P and 17,20 α -P had a similar seasonal pattern (Fig. 6). They were very low or undetectable in the winter, increased significantly in the spring and early summer, and reached the highest values in August. No significant differences were found in 17,20 β ,21-P plasma concentrations from tench captured in July and August.

Table I. Seasonal changes in the relative weight of the gonads in male and female tench (*Tinca tinca*, L.)

MONTH	n	GONADOSOMATIC INDEX (%)		
		FEMALES	n	MALES
February	34	2.4±0.1 ^c	29	0.26±0.01 ^c
May	32	4.02±0.11 ^b	32	0.36±0.02 ^b
July	10	7.95±1.12 ^a	10	0.66±0.1 ^a
August	35	2.27±0.1 ^c	29	0.27±0.02 ^c
November	32	2.25±0.09 ^c	32	0.21±0.02 ^d

Gonadosomatic index= gonad weight/body weight x 100. n=number of fish. Values are expressed as mean±SEM. Different letters indicate statistically significant differences between seasons.

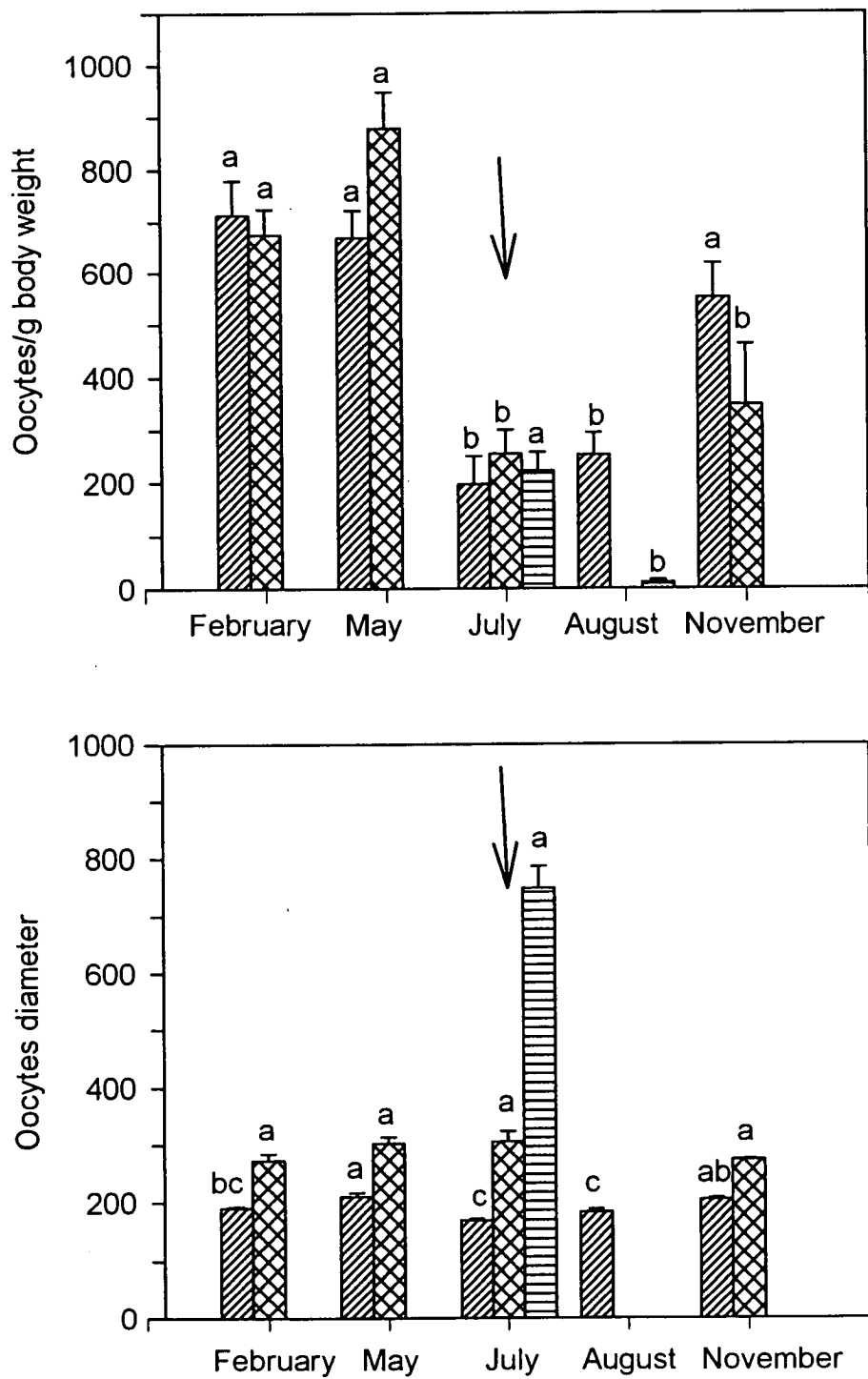





Figure 1. Seasonal changes in the number of oocytes/g body weight (upper graph) and in the oocyte diameters (lower graph) in the ovary of female tench.  stage C (early yolk vesicle),  stage D (late yolk vesicle),  stage E (vitellogenic). Data are expressed as mean \pm SEM. Different letters indicate statistically significant differences among seasons.

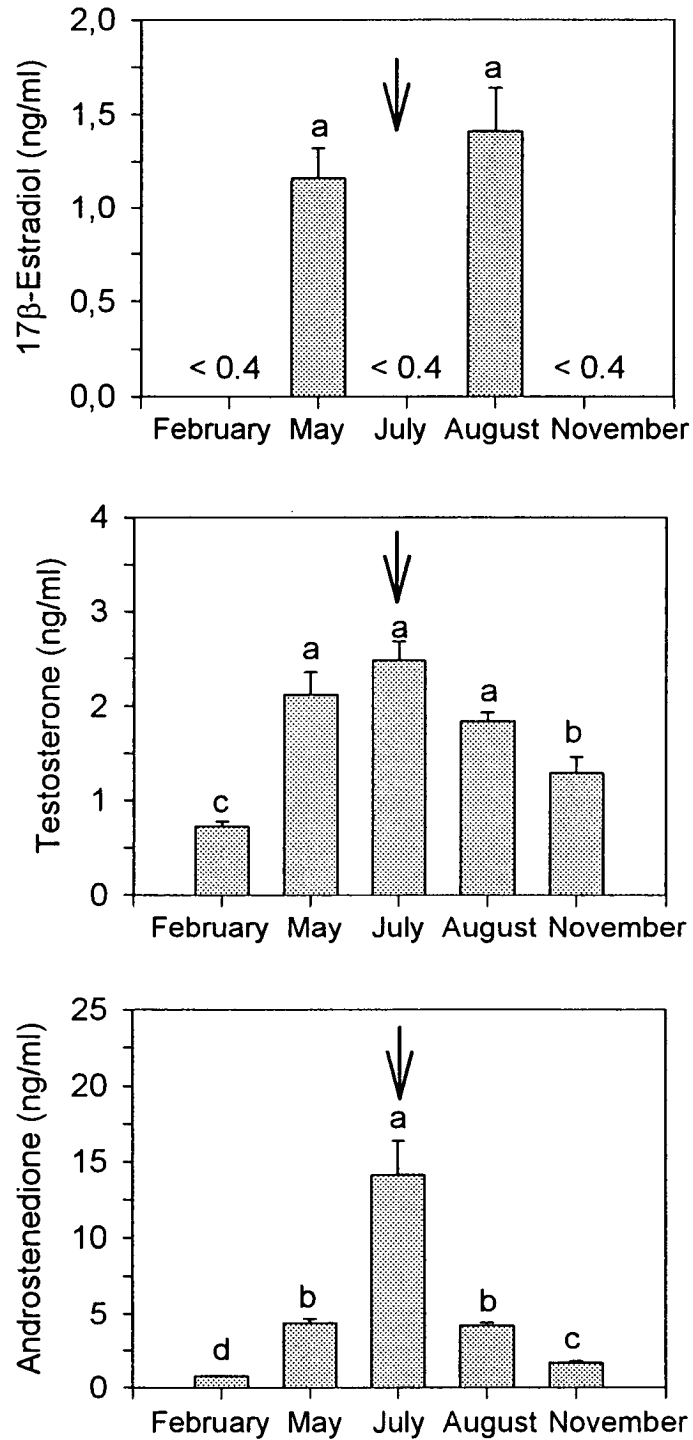


Figure 2. Seasonal changes in plasma concentrations of 17 β -estradiol (E₂), testosterone and androstenedione in female tench. The arrow indicates the time of peak spawning. Data are expressed as mean \pm SEM. Different letters indicate statistically significant differences among seasons.

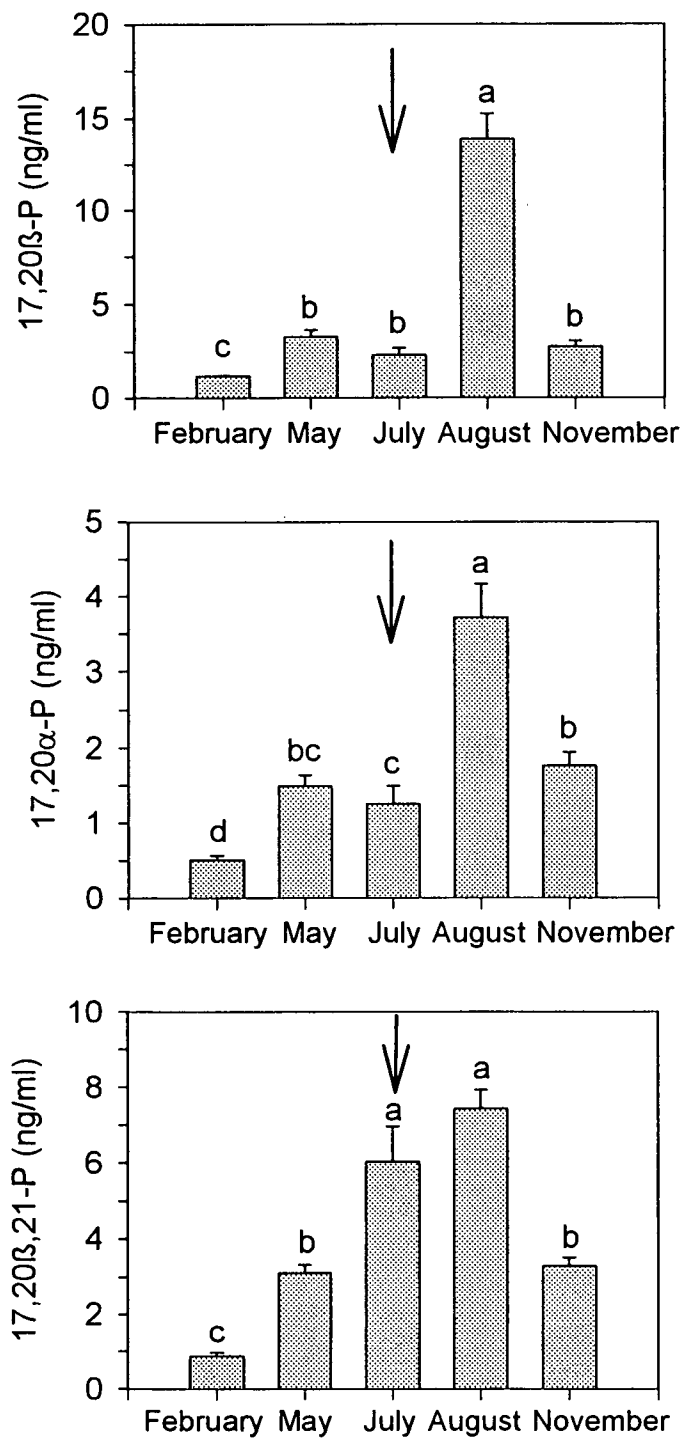


Figure 3. Seasonal changes in plasma concentrations of 17,20β-P, 17,20α-P and 17,20β,21-P in female tench. The arrow indicates the time of peak spawning. Data are expressed as mean ± SEM. Different letters indicate statistically significant differences among seasons.

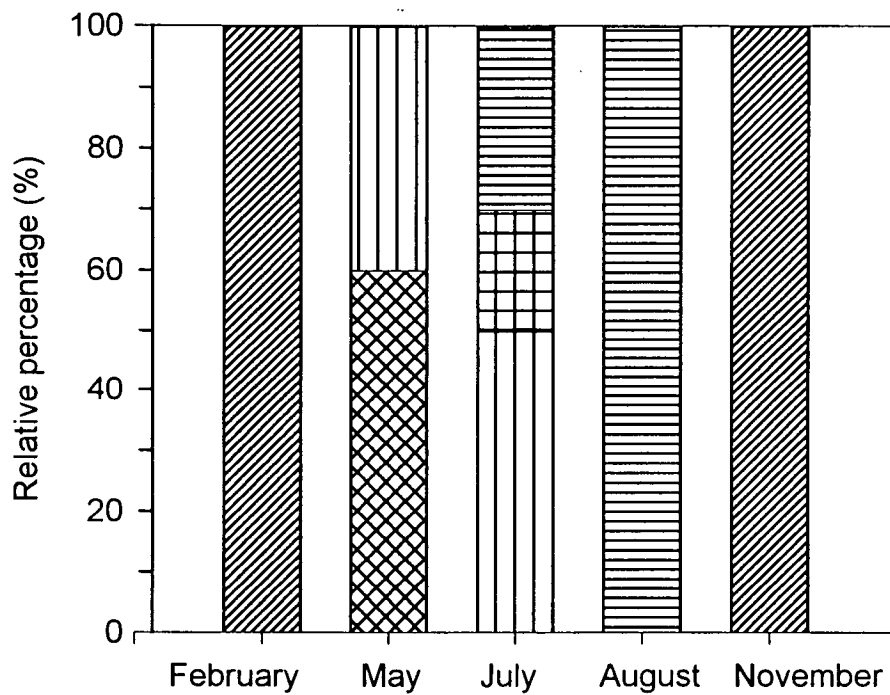







Figure 4. Seasonal changes in the relative percentages of the different spermatogenic stages in the testis of male tench.  *Stage I* (mostly spermatogonia and primary spermatocytes),  *Stage II* (secondary spermatocytes, and spermatids),  *Stage III* (secondary spermatocytes, spermatids and spermatozoa),  *Stage IV* (predominantly spermatozoa) and  *Stage V* (spermatogonia and resorbing spermatozoa).

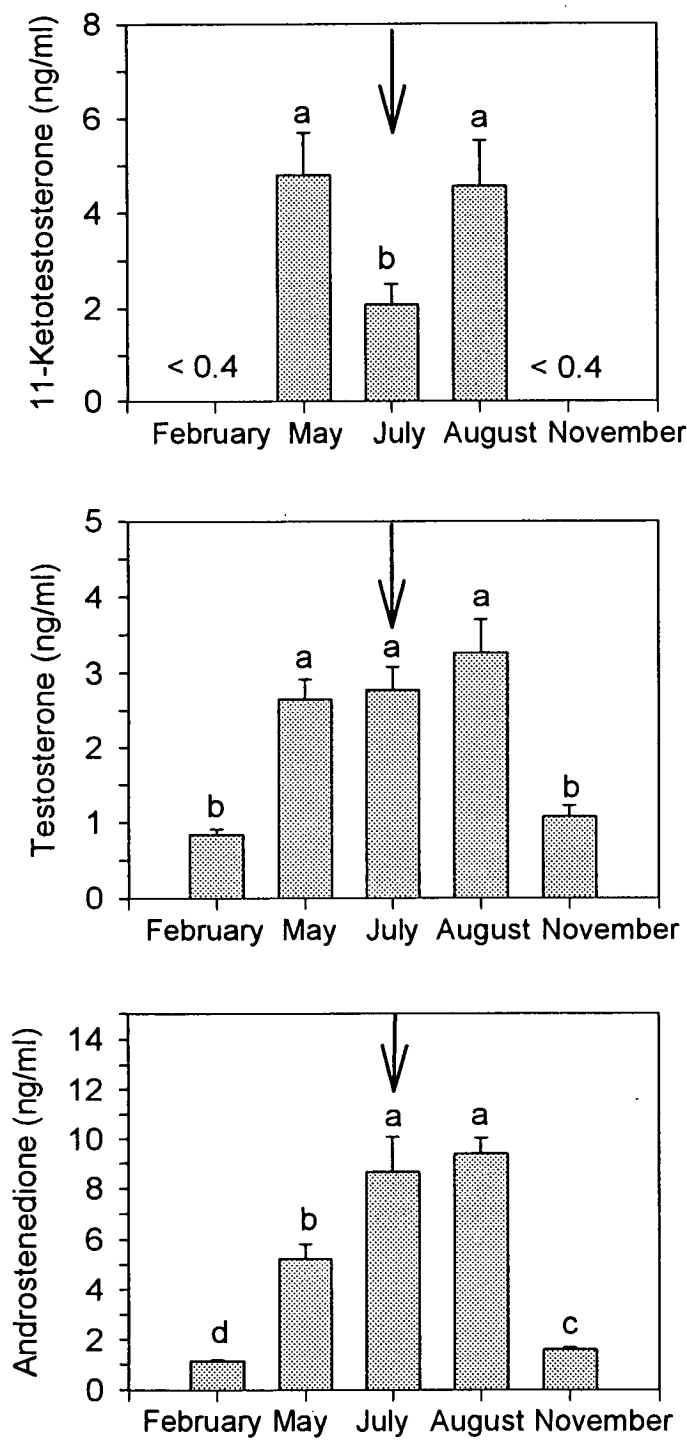


Figure 5. Seasonal changes in plasma concentrations of 11-ketotestosterone (11-KT), testosterone and androstenedione in male tench. The arrow indicates the time of peak spawning. Data are expressed as mean \pm SEM. Different letters indicate statistically significant differences among seasons.

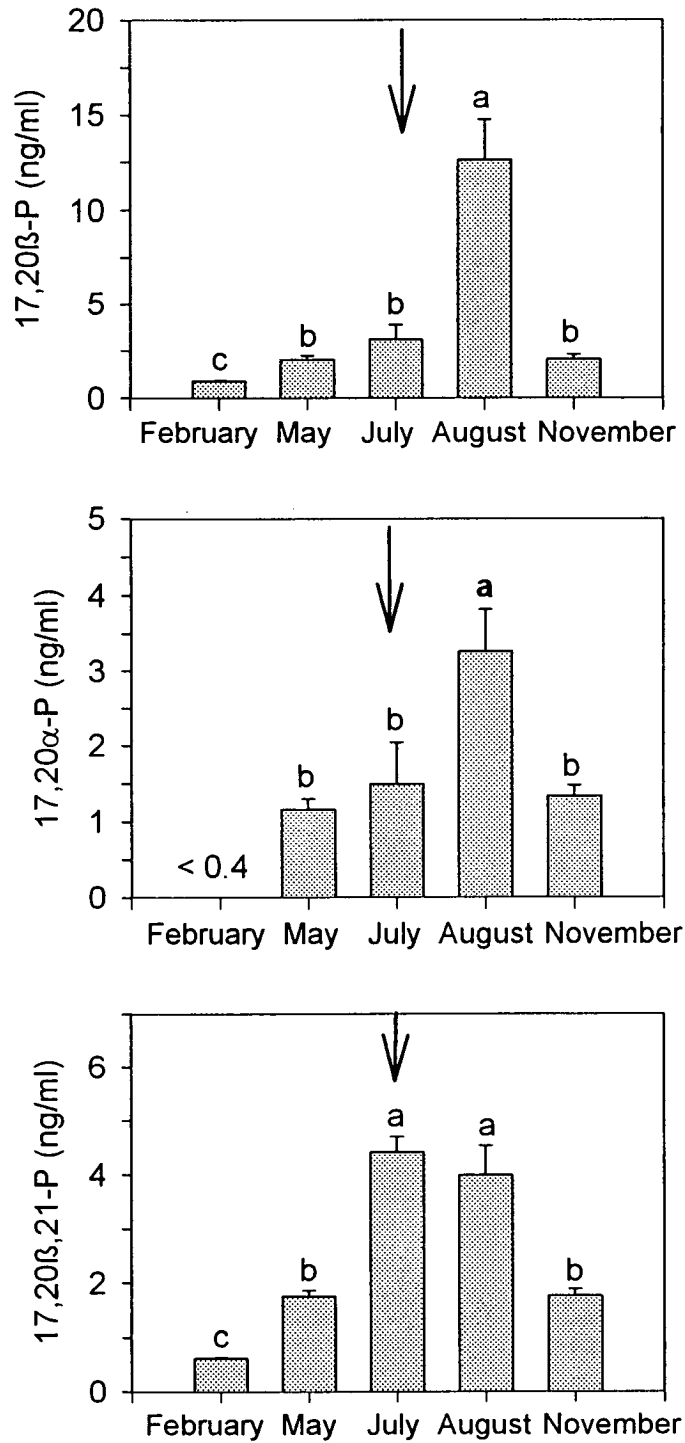


Figure 6. Seasonal changes in plasma concentrations of 17,20β-P, 17,20α-P and 17,20β,21-P in male tench. The arrow indicates the time of peak spawning. Data are expressed as mean ± SEM. Different letters indicate statistically significant differences among seasons.

DISCUSSION

This paper provides new data on the seasonal reproductive cycle in a tench population from the south-west of Europe, studying the different stages of the gonadal development and the changes in concentration of several gonadal steroids that have not been previously characterised in this cyprinid.

The pronounced seasonal changes in GSI are well correlated with seasonal pattern in metabolic resources. During the cold months, tench accumulate reserves that are then used for later gonadal development (Guijarro, Lopez-Patiño, Pinillos, Isorna, De Pedro, Alonso-Gómez, Alonso-Bedate and Delgado, 2003).

In female tench bred in central Europe the spawning season is in summer, and a period of sexual quiescence occurs after spawning until the following spring (Breton *et al.*, 1980). The tench population in the present study (from the south-west of Europe) also spawn at the beginning of summer, but the recruitment of a high proportion of the next generation of oocytes (stages C and D) appears to occur during autumn and winter.

The spring E₂ concentrations found in the present work are similar to those measured in female tench in a recent study also under natural conditions in spring (Martin *et al.*, 1999), but are significantly higher than those in earlier studies (<0.1 ng/ml; Simontacchi *et al.*, 1984). This discrepancy could be due to differing environmental conditions, as Martin *et al.* (1999) showed that E₂ concentrations in female tench exhibited a 3-fold increase with temperature and light stimulation. The presence of E₂ in the plasma of tench in the spring coincides, as expected, with the vitellogenic period.

Testosterone and androstenedione are common constituents in the plasma from female teleosts - with concentrations often exceeding those found in males (Borg, 1994). Both steroids exhibit a very similar seasonal pattern of secretion, although the peak of androstenedione during spawning is much more pronounced (3-fold increase). Androstenedione could contribute to stimulate the build up of gonadotropin II in the

pituitary, as has been reported for testosterone (Crim *et al.*, 1981; Antonopoulou *et al.*, 1999). Recently, androstenedione has also been shown to function as a pheromone in *Carassius auratus* (Poling, Fraser & Sorensen, 2001).

In the majority of teleosts that have been studied, spawning is associated with elevated plasma concentrations of 17,20 β -P and/or 17,20 β ,21-P (Scott & Canario, 1987), which trigger oocyte final maturation. 17,20 β -P is the most common 'maturation inducing steroid' (MIS) (Scott & Canario, 1987), but 17,20 β ,21-P is equally potent with 17,20 β -P in bringing about *in vitro* oocyte final maturation in species such as North Sea plaice (Canario & Scott, 1990), rainbow trout *Salmo gairdneri* (Canario & Scott, 1988) and Atlantic croaker *Micropogonias undulatus* (Trant & Thomas, 1989). In common with goldfish (Scott & Sorensen, 1994) and walking catfish *Clarias batrachus* (Zairin, Asahina, Furukawa & Aida, 1992), female tench have both variants of the teleost MIS in their plasma. However, in the present study, a most striking observation was that the presence of neither steroid was associated exclusively with the time of spawning. In fact, the concentrations of both steroids were highest after spawning, when most ovaries contained only primary oocytes. Circulating concentrations were also significantly elevated in the spring, when the fish had not even started to produce any vitellogenic oocytes. This is clearly not the expected pattern for a maturation-inducing steroid. Similar results are reported in the European roach (*Rutilus rutilus*), in which females not yet ready for spawning (some of them without any signs of vitellogenic oocytes) release into the water substantial amounts of 17,20 β -P (Lower, Scott & Moore, 2000). This suggests that, at least in some species, the role of 17,20 β -P may not be restricted to the induction of oocyte final maturation. Another possible explanation for the high concentrations of sex steroids in post-spawning female tench is provided by research on rainbow trout. This research shows a surge in gonadotrophin and 17,20 β -P concentrations which continues for up to 6

weeks beyond the time of ovulation (Scott, Sumpter & Hardiman, 1983). The prolongation of this surge in trout is enhanced if ovulated eggs are allowed to remain within the body cavity (Breton, Govoroun & Mikolajczyk, 1998).

The other C_{21} steroid, $17,20\alpha\text{-P}$, a steroid commonly found in some cyprinid fish (Ebrahimi, Scott & Kime, 1996), is also present in the plasma of the tench, and exhibits a similar seasonal pattern to the others C_{21} steroids. However, the physiological function of this steroid is unknown to date.

From our results it can be concluded that the ovarian development in the tench populations from the south-west of Europe is asynchronous, i.e. oocytes at different stages of development can be found simultaneously in the ovary, as previously reported in this species (Breton *et al.*, 1980). Moreover, the measurement of stage E oocytes in tench captured in July is within a very narrow range (700 to 800 μm diameter). This asynchronic development differs from the one found in the mackerel *Scomber scombrus* L. and Dover sole *Solea solea* L., where a wide range in diameters of vitellogenic oocytes is observed (Emerson *et al.*, 1990). In the present study, the three-fold difference between the number of stage E oocytes in the early summer and the number of stage D oocytes in the spring, suggests that each female tench possibly produces up to three batches of eggs. Then, if they do so, they must wait to spawn one batch of eggs before recruiting another into vitellogenesis. This is probable, as it has been reported that female tench from central Europe spawn at intervals of fifteen to twenty two days during the course of the spawning season (Linhart & Billard, 1995). This is probably sufficient time for a stage D oocyte to grow into a fully mature stage E oocyte.

The seasonal pattern of spermatogenesis and androgen concentrations matches previously described reproductive cycles for most teleost species (Borg, 1994). The peak concentrations of 11-KT in the blood of male tench are low compared to previous studies

in teleosts. Nevertheless, a broad range in 11-KT plasma levels can be found depending on the species (from 1.6 ng/ml in the *Ictalurus nebulosus* (Burke, Leatherland & Sumpter, 1984) to 450 ng/ml in *Clarias macrocephalus* (Tan-Fermin, Miura, Ueda, Adachi & Yamauchi, 1997). We can not discard the possible occurrence of another peak of 11-KT between sample times, but the relatively small GSI in the male tench justify such low hormone concentrations.

During July when the spawning took place we observed an augmentation in the plasma concentration of the same C₂₁ steroids as found in the females. They are possibly involved in the control of spermiation in the tench. Nevertheless, the fact that they remain elevated in postspawning males (in August), as occurred in females, suggest that these C₂₁ steroids are probably involved in other processes besides spawning. Based on studies on other cyprinids (Stacey, Sorensen, Dulka, Cardwell & Irvine, 1991) their role as pheromones seems probable - but has yet to be established.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the staff of the “Centro de Acuicultura Las Vegas del Guadiana” for kindly providing the tench and permitting the use of their installations. We also are very grateful to A. Guijarro, M. López, E. Isorna and N. De Pedro who assisted with the sample collections, to C. Mugnier who helped with the performance of the assays, and to P. Witthames for advice on histometry. This work was supported by a predoctoral grant from the Spanish MEC to M.L. Pinillos.

REFERENCES

- Antonopoulou E., Mayer I., Borg B., Swanson P., Murza I. & Christoforov O. (1999) Effects of testosterone on gonadotropins, testes and plasma $17\alpha,20\beta$ -dihydroxy-4-pregnene-3-one levels in postbreeding mature Atlantic salmon, *Salmo salar*, male parr. *Journal of Experimental Zoology* **284**, 425-436.
- Baynes S.M. & Scott A.P. (1985) Seasonal variations in parameters of milt production and in plasma concentrations of sex steroids of male rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *General and Comparative Endocrinology* **57**, 150-160.
- Borg B. (1994) Androgens in teleost fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology* **109C**, 219-245.
- Breton B., Horoszewicz L., Bieniarz K. & Epler P. (1980) Temperature and reproduction in tench: effect of a rise in the annual temperature regime on gonadotropin level, gametogenesis and spawning. II. The female. *Reproduction, Nutrition and Development* **20**, 1011-1024.
- Breton B., Govoroun M. & Mikolajczyk T. (1998) GTH I and GTH II secretion profiles during the reproductive cycle in female rainbow trout: relationship with pituitary responsiveness to GnRH-A stimulation. *General and Comparative Endocrinology* **111**, 38-50.
- Burke M.G., Leatherland J.F. & Sumpter J.P. (1984) Seasonal changes in serum testosterone, 11-ketotestosterone, and 17β -estradiol levels in the brown bullhead, *Ictalurus nebulosus* Lesueur. *Canadian Journal of Zoology* **62**, 1195-1199.
- Canario A.V.M. & Scott A.P. (1988) Structure-activity relationships of C21 steroids in an *in vitro* oocyte maturation bioassay in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *General and Comparative Endocrinology* **71**, 338-348.
- Canario A.V.M. & Scott A.P. (1990) Effects of steroids and human chorionic gonadotropin

- on *in vitro* oocyte final maturation in two marine flatfish: the dab, *Limanda limanda* and the plaice, *Pleuronectes platessa*. *General and Comparative Endocrinology* **77**, 161-176.
- Crim L.W., Peter R.E. & Billard R. (1981) Onset of gonadotropic hormone accumulation in the immature trout pituitary gland in response to estrogen or aromatizable steroid hormones. *General and Comparative Endocrinology* **44**, 374-381.
- Ebrahimi M., Scott A.P. & Kime D.E. (1996) Extragonadal production of 17,20-dihydroxy-4-pregnen-3-ones in teleost fish. *General and Comparative Endocrinology* **104**, 296-303.
- Emerson L.S., Greer Walker M. & Witthames P. R. (1990) A stereological method for estimating fish fecundity. *Journal of Fish Biology* **36**, 721-730.
- Epler P., Bierniarz K. & Horoszewicz L. (1981) Effect of different thermal regimes on reproductive cycles of tench *Tinca tinca* (L.) Part III. Histological characteristics of ovaries. *Polskie Archiwum Hydrobiologii* **28**, 197-205.
- Guijarro A.I., Lopez-Patiño M., Pinillos M.L., Isorna E., De Pedro N., Alonso-Gómez A.L., Alonso-Bedate M. & Delgado M.J. (2003) Seasonal changes in haematology and metabolic resources in the tench. *Journal of Fish Biology* **62**: In press.
- Linhart O. & Billard R. (1995) Biology of gametes and artificial reproduction in common tench, *Tinca tinca* (L.). A review. *Polskie Archiwum Hydrobiologii* **42**, 37-56.
- Lower N.J., Scott A.P. & Moore A. (2000) Release of sex steroids into the water by roach (*Rutilus rutilus*). In: *Proceedings of the Sixth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish* (ed. by B. Norberg, O.S. Kjesbu, G.L. Taranger, E. Andersson & S.O. Stefasson), pp.198. Norway, Bergen.
- Martin P., Rebollar P.G., San Juan L.D., Illera J.C. & Alvariño J.M. (1999) Plasma estradiol-17beta levels and gonadosomatic index in tench (*Tinca tinca*, L.) reared in

- natural and controlled conditions. *Journal of Physiology and Biochemistry* **55**, 309-314.
- Miura T., Kasugai T., Nagahama Y. & Yamauchi K. (1995) Acquisition of potential for sperm motility *in vitro* in Japanese eel *Anguilla japonica*. *Fisheries Science* **61**, 533-534.
- Moore R.K., Scott A.P. & Collins P.M. (2000) Circulating C-21 steroids in relation to reproductive condition of a viviparous marine teleost, *Sebastes rastrelliger* (Grass Rockfish). *General and Comparative Endocrinology* **117**, 268-280.
- Pankhurst N.W. & Carragher J.F. (1991) Seasonal endocrine cycles in marine teleost. In: *Proceedings of the 4th International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish*. (ed. by A.P. Scott, J.P. Sumpter, D.E. Kime & M.S. Rolfe), pp. 131-135. Sheffield, UK.
- Pérez-Regadera J.J. & Velasco-Gemio R. (1995) Reproduction of tench *Tinca tinca* (L., 1758) in spawning ponds. *Polskie Archiwum Hydrobiologii* **42**, 57-61.
- Pimpicka E. (1990) Formation of fecundity of tench, *Tinca tinca* (L.) females in Lake Drweckie. *Acta Ichthyologica et Piscatoria* **20**, 53-75.
- Pimpicka E. & Koryzno A. (1995) Ovary development in juvenile tench, *Tinca tinca* reared in different thermal conditions. *Polskie Archiwum Hydrobiologii* **42**, 75-83.
- Poling K.R., Fraser E.J. & Sorensen P.W. (2001) The three steroidal components of the goldfish preovulatory pheromone signal evoke different behaviors in males. *Comparative Biochemistry and Physiology* **129B**, 645-651.
- Scott A.P., Sumpter J.P. & Hardiman P.A. (1983) Hormone changes during ovulation in the rainbow trout *Salmo gairdneri* (Richardson). *General and Comparative Endocrinology* **49**, 128-134.
- Scott A.P., MacKenzie D.S. & Stacey N.E. (1984) Endocrine changes during natural

- spawning in the white sucker, *Catostomus commersonii*. II. Steroid hormones. *General and Comparative Endocrinology* **56**, 349-359.
- Scott A.P. (1987) Reproductive Endocrinology of Fish. In: *Fundamentals of Comparative Vertebrate Endocrinology* (ed. by I. Chester-Jones, P.M. Ingleton & J.G. Phillips), pp. 223-256. Plenum Press, New York and London.
- Scott A.P. & Canario A.V.M. (1987) Status of oocyte maturation-inducing steroids in teleost. In: *Proceedings of the 3rd International Symposium on Reproductive Physiology of Fish* (ed. by D.R. Idler, L.W. Crim & J.M. Walsh), pp. 224-234. Marine Science Research Laboratory, St. John's, Newfoundland, Canada.
- Scott A.P. & Sorensen P.W. (1994) Time course of release of pheromonally active gonadal steroids and their conjugates by ovulatory goldfish. *General and Comparative Endocrinology* **96**, 309-323.
- Simontacchi C., Ceccarelli P., Lombardi F. & Minervini R. (1984) Livelli plasmatici di alcuni steroidi sessuali durante il ciclo riproduttivo annuale della tinca (*Tinca tinca*). *Atti della Società Italiana di Scienze Veterinarie* **38**, 137-140.
- Stacey N.E., Sorensen P.W., Dulka J.G., Cardwell J.R. & Irvine A.S. (1991) Fish sex pheromones: current status and potential applications. *Bulletin of the Institute of Zoology, Academica Sinica Monograph* **16**, 189-227.
- Swanson P. (1991) Salmon gonadotropins: reconciling old and new ideas. In: *Proceedings of the 4th International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish* (ed. by A.P. Scott, J.P. Sumpter, D.E. Kime & M.S. Rolfe), pp. 2-7. Sheffield, UK.
- Tan-Fermin J.D., Miura T., Ueda H., Adachi S. & Yamauchi K. (1997) Testicular histology and serum steroid hormone profiles in hatchery-bred catfish *Clarias macrocephalus* (Gunther) during an annual reproductive cycle. *Fisheries Science* **63**, 681-686.

- Trant J.M. & Thomas P. (1989) Isolation of a novel maturation-inducing steroid produced *in vitro* by ovaries of Atlantic croaker. *General and Comparative Endocrinology* 75, 397-404.
- Tyler C.R. & Sumpter J.P. (1996) Oocyte growth and development in teleost. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 6, 287-318.
- Wallace R.A. (1985) Vitellogenesis and oocyte growth in nonmammalian vertebrates. In: *Developmental Biology* (ed. by L.W. Browder), pp. 127-177. New York.
- Zairin M., Asahina K., Furukawa K. & Aida K. (1992) Plasma steroid hormone profiles during HCG induced ovulation in female walking catfish *Clarias batrachus*. *Zoological Science* 9, 607-617.

4. Capítulo II

“Liberación de esteroides sexuales al agua en los peces”

4.1. Objetivos y diseño experimental

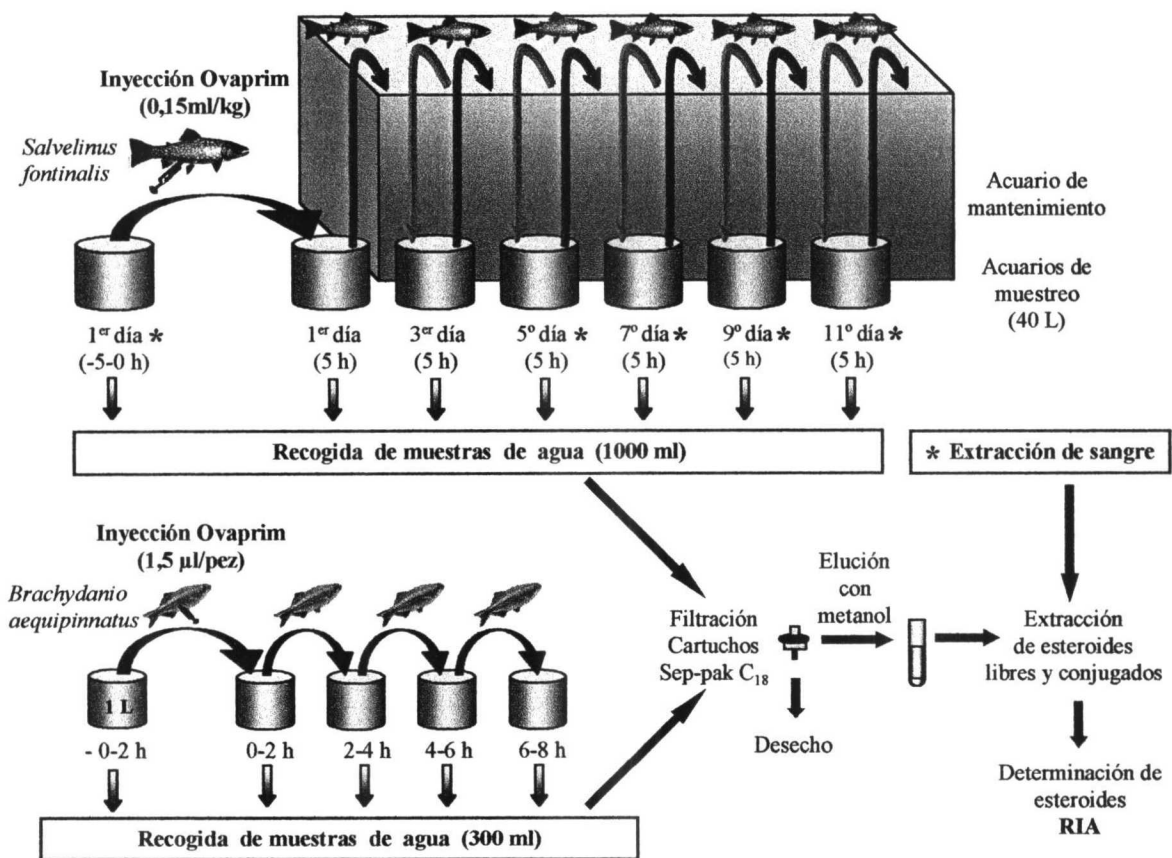
La liberación de esteroides al agua ha sido descrita en numerosas especies de teleósteos. La determinación de los esteroides liberados por los peces al agua representa una herramienta de enorme utilidad, tanto por sus aplicaciones en la investigación de la fisiología endocrina de estas especies, como por su potencial empleo en las explotaciones intensivas de peces. Tanto la cantidad, como el tipo de esteroides que los peces liberan al agua, son fiel reflejo de su estado fisiológico, por lo que el establecimiento del tipo de esteroides liberados, la dinámica de su liberación y las concentraciones en el agua nos proporcionan una información excelente del estado reproductor del animal, evitando la necesidad de manipular los ejemplares, y los múltiples inconvenientes de diversa índole que esta manipulación conlleva.

En este capítulo de la presente Memoria hemos incluido dos artículos, el primero corresponde a un capítulo de libro en el que presentamos una revisión sobre el interés y la utilidad de medir esteroides en el agua como alternativa a las determinaciones sanguíneas. Se hace un resumen de los esteroides producidos por los peces, las potenciales vías de excreción de dichos esteroides al agua y su importancia relativa. Se ofrece un panorama general de las posibles alternativas metodológicas de este procedimiento, y sus ventajas e inconvenientes, así como de las relaciones entre las concentraciones de esteroides en la circulación sanguínea y las cuantificadas en el agua. Finalmente, se discuten algunas de las posibles utilidades de esta aproximación metodológica como alternativa en la investigación endocrina de peces. Muy brevemente queremos destacar la posibilidad que ofrece esta metodología para monitorizar la actividad endocrina (ejes gonadal y adrenal) sin perturbar a los animales, y la oportunidad que ofrece para el abordaje del estudio del sistema feromonal en los peces.

La segunda parte de este capítulo corresponde al estudio realizado con el objetivo de establecer la tasa de liberación de esteroides sexuales al agua en el momento de la oviposición en dos especies de teleósteos, el salmónido, *Salvelinus fontinalis* y el ciprínido, *Brachydanio aequipinnatus*. El planteamiento de este estudio se realizó en base a las diferencias notables existentes entre distintos órdenes de teleósteos en relación con las concentraciones plasmáticas de ciertos esteroides relevantes para el proceso de la maduración final del ovocito, como es el caso del 17,20 β -P, y dado que para ninguna de estas dos especies existe información previa relativa a este aspecto de liberación de esteroides al agua.

El estudio se realizó en hembras maduras a las que se indujo la maduración de folículos ováricos con una inyección intraperitoneal de "Ovaprim" (Syndel International Inc., mezcla farmacológica que incluye un análogo de la hormona liberadora de gonadotropinas de salmón junto a un inhibidor dopaminérgico).

Los peces se situaban individualmente en acuarios por un periodo previo de 5h (para *Salvelinus*) y 2 h (para *Brachydanio*), transcurrido el cual se recogen muestras de agua de 1000 ml y 300 ml, respectivamente. A continuación, y previa extracción de muestras de sangre en *Salvelinus* (el reducido tamaño de *Brachydanio* no lo permite), todos los peces fueron inyectados con Ovaprim. En el caso de *Salvelinus* las sucesivas recogidas de muestras de agua se realizaron los días 1, 3, 5, 7, 9 y 11 a partir de los acuarios individuales en los que los peces permanecieron durante las 5 horas previas a la recogida. Así mismo, los días 5, 7, 9 y 11 tras el muestreo del agua se extrajeron muestras de sangre. En el caso de *Brachydanio* los muestreos de agua se realizaron a las 2, 4, 6 y 8 h postinyección (Esquema 8). La extracción de los esteroides a partir de las muestras de agua se realizó mediante cartuchos "Sep-pak plus C₁₈". Los cartuchos con los esteroides retenidos eran sellados y congelados a -80°C hasta su posterior procesamiento en el laboratorio. Tras la separación de las fracciones libre, sulfatada y glucuronizada se cuantificó la concentración de esteroides por radioinmunoensayo (para más detalles metodológicos ver el apartado de material y métodos del artículo 3).



Esquema 8. Diseño experimental realizado para la valoración de los esteroides sexuales que son liberados al agua por *Salvelinus fontinalis* y *Brachydanio aequipinnatus*.

4.2. Artículo 2

**“WHY MEASURE STEROIDS IN FISH PLASMA WHEN YOU CAN MEASURE
THEM IN WATER?”**

A.P. SCOTT, M. PINILLOS AND T. ELLIS

The Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science, Barrack Road, The
Nothe, Weymouth, Dorset, DT4 8UB, UK

Author for correspondence:

A. P. Scott, (Fax: +44 (0) 1305 206601; E-mail: a.p.scott@cefas.co.uk)

PUBLICADO EN: *Perspectives in Comparative Endocrinology: Unity and Diversity.*

(Goos, H. J. Th., Rastogi, R. K., Vaudry, H. & Pierantoni, R. eds.), pp. 1291-1295.

°Bologna, Italy: Monduzzi Ed. (2001)

SUMMARY

The measurement of steroid concentrations in water rather than in blood plasma, has potential in a number of situations: to study steroidal pheromones; to measure sequential hormonal changes in fish from which it is difficult to get a blood sample (because the fish are too valuable or too small); to carry out non-invasive studies on stress and reproductive status. The main site of release of 'free' (as opposed to conjugated) steroids is the gills. Steroid concentrations in the water are related to levels in the plasma. Some steroids are released more readily than others –probably due to their affinity for steroid binding proteins.

What steroids are produced by fish?

Fish gonads produce a range of estrogens (C_{18}), androgens (C_{19}) and progesterone-like (C_{21}) steroids. The main estrogen produced by female teleosts is, as in mammals, 17β -oestradiol. Also, as in mammals, the C_{18} steroids, testosterone (T) and androstenedione, are common products of teleost gonads. However, in teleosts, they can occur in the blood plasma of females as well as males. The male-specific androgen in teleosts is 11-ketotestosterone. Teleost gonads produce many different types of C_{21} steroids. However, most female teleosts produce, at the time of oocyte final maturation, the 'maturation-inducing hormone' (MIH) $17,20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one ($17,20\beta$ -P). As in humans, the main corticosteroid produced by fish when they are stressed is cortisol. Conjugation plays an important role during both the synthesis and disposal of steroids in fish. The two main types of conjugated steroids in fish are sulphates and glucuronides. They can be formed directly in the gonads or by peripheral metabolism.

How do steroids get into the water?

There are several potential routes of excretion of steroids into the water: gills; urine; faeces (via the bile); skin; seminal or ovarian fluid; specialised organs (e.g. the seminal vesicles of the African catfish). In a study by Vermeirssen & Scott (1996) on the fate of injected radioactive 17,20 β -P in rainbow trout, most of the steroid had disappeared from the circulation by 6 h. During that time, 40% had been released through the gills, 35% was present in the bile and 10% had been released in the urine. The material released from gills was essentially unmodified 'free' steroid; that in the bile was mostly glucuronidated; and that in the urine was mostly sulphated. A later study confirmed that the gills also appear to be the main source of free steroids which are released into water by goldfish (Sorensen *et al.*, 2000). The measurement of intact steroids which have 'leaked' from the gills forms the basis of our procedure – rather than the measurement of urinary or faecal metabolites.

How are steroids measured in water?

The concentrations of steroids in water are normally too low to be assayed directly. There are two ways to overcome this problem:

Extraction with organic solvents. Samples of water are shaken with organic solvents such as diethyl ether, the solvent dried down and the residue redissolved in a small amount of assay buffer. The drawbacks to the method are: the large amount of solvent that needs to be used if one is extracting a large amount of water; only the 'free' (non-conjugated) steroid fraction is extracted.

Solid phase extraction cartridges. This involves pumping or drawing water through cartridges containing octadecylsilane. Free, sulphated and glucuronidated steroids are all trapped by the matrix and can be eluted with a small amount of methanol. This is the

method of choice for extracting steroids from water and is described in detail by Scott & Sorensen (1994). This same paper also describes how free, sulphated and glucuronidated steroids can be quantified separately.

Are plasma and water steroid concentrations related?

A comparison between the results of Scott & Sorensen (1994) and Moriwaki *et al.* (1991) on water and plasma steroid concentrations, respectively, in HCG-injected female goldfish, shows that the rise and fall of 17,20 β -P and T in water exactly matches that found in the plasma. However, the peak of 17,20 β -P in water is higher than that of T, whereas the reverse is true in the plasma.

What applications are there?

The study of fish pheromones – several of which, in fish, have been shown to be steroids. The one which is best known is 17,20 β -P in goldfish. In the hours leading up to spawning, this steroid is produced in the gonads in order to induce oocyte final maturation. From the gonads, it finds its way into the bloodstream and from there into the water, where it is detected by specific receptors on the olfactory epithelium of male goldfish. This causes an increase in gonadotropin concentrations in the blood and an increase in sperm production. The pattern of release of 17,20 β -P by the females and the ‘active space’ of the pheromone have been determined by extraction and assay of not only 17,20 β -P, but a range of other steroids, from the water (Scott & Sorensen, 1994).

Monitoring the reproductive status of fish but without having to disturb them. 17,20 β -P is not used as a pheromone by all species. However, it is still released into the water at the time of oocyte final maturation (Vermerissen & Scott, 1996). This means that one has the

potential to monitor the final maturation process without having to bleed or, in some cases, even handle the fish. The method is particularly useful when one is dealing with fish which are too small or too valuable to take blood samples.

Monitoring stress in fish – but without any effect of sampling stress. This is a potentially very important application. To date, all studies on the time course of the stress response in fish have had to take into account the fact that the very act of catching and bleeding a fish is a stress in itself. The only way that researchers have been able to get around this problem is to employ a large number of replicate tanks and to use a different tank of fish at each time point. We have now shown (Fig. 1), by measurement of cortisol in the water outflow, that one can continuously follow the cortisol response to stress in single tanks of fish. The specificity of the cortisol immunoassay has been tested by running water extracts on TLC (Fig. 2; note >98% of the activity co-eluted with ^3H -cortisol).

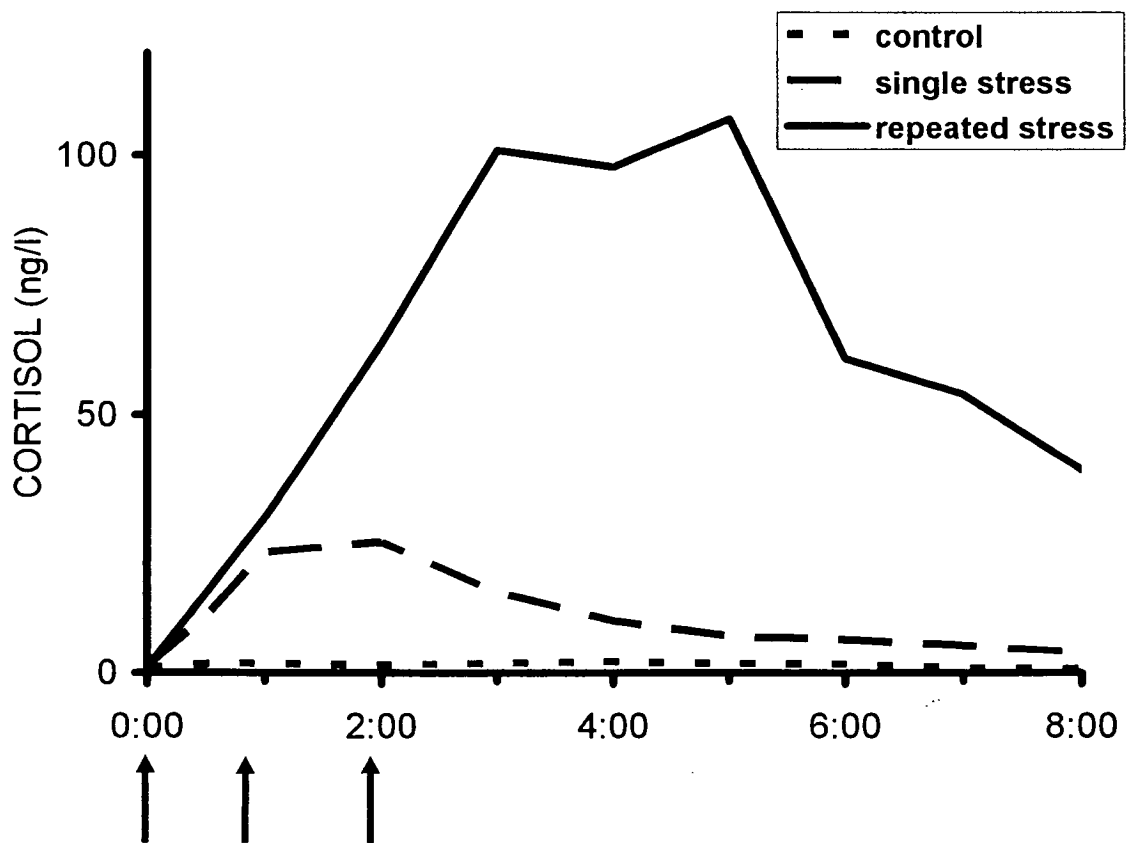


Fig. 1 Effect of a single or a repeated stress (lifting fish out of tank for 90 sec) on the amounts of cortisol released by rainbow trout. Tank volume = 150 L ; flow rate = 2 L·min⁻¹; fish density 30 kg·m⁻³; temperature = 15 °C; control = no stress. Arrows indicate time of application of stress.

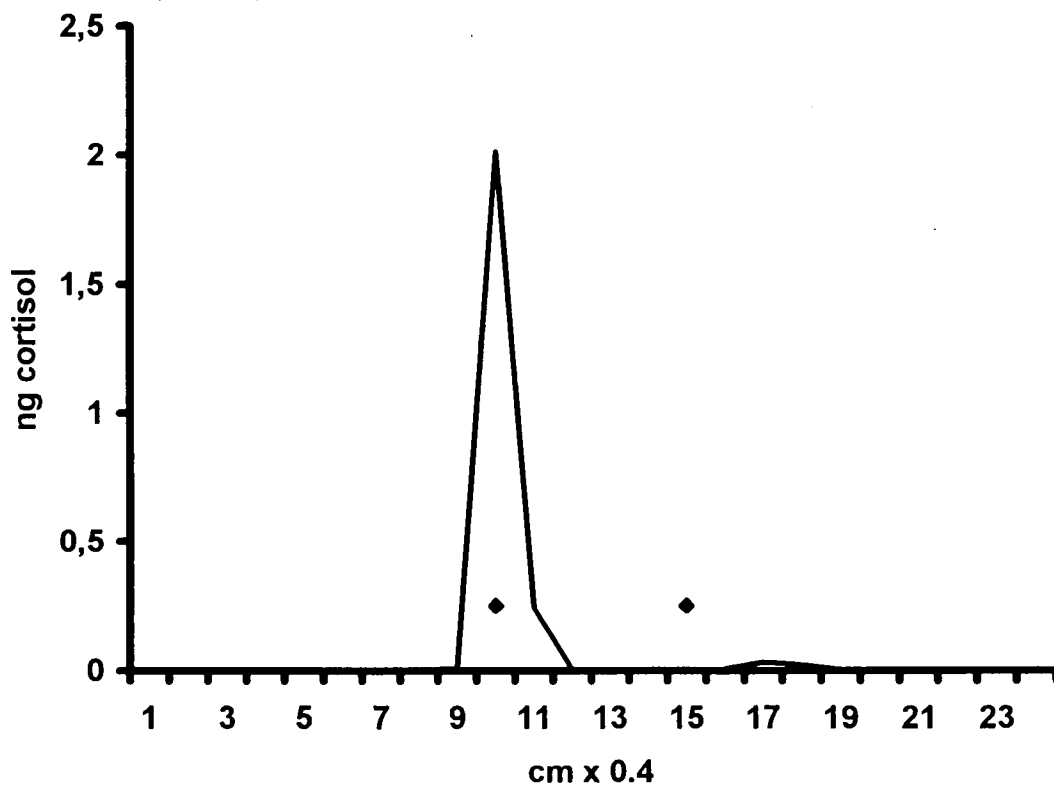


Fig. 2 Thin-layer chromatographic separation of material which cross-reacts with the cortisol antiserum in water extracts from rainbow trout tanks. The elution positions of cortisol and cortisone, respectively, are shown by diamonds.

Are there any interesting implications?

The fact that unmodified steroids are released via the gills and are just as easily reabsorbed (Vermeirssen & Scott, 1996) might explain some of the reports of 11-KT being found in the blood of female fish and of E_2 in the blood of males. Also, the fact that some steroids, such as T, are released less readily than others, such as 17,20 β -P, may be because they bind more avidly to plasma sex steroid binding proteins.

The measurement of stress by the measurement of cortisol in water is a potentially powerful indicator for fish welfare studies. Research we have carried out to date have been very encouraging, although much remains to be done on the interactive effects of density, water flow rate, temperature and fish size on cortisol release.

The pros and cons of measurement of conjugated steroids and metabolites released in faeces and/or urine of fish are considered by Oliviera et al. (1999).

We acknowledge the financial support of DEFRA, UK

REFERENCES

- MORIWAKI, T., KOBAYASHI, M. AIDA, K. & HANYU, I. Changes in plasma gonadotropin and steroid hormone levels during ovulation induced by HCG treatment in female goldfish. *Nippon Suisan Gakkaishi* 57, 41-43, 1991.
- OLIVIERA, R.F., CANARIO, A.V.M. & BSHARY, R. Hormones, behaviour and conservation of littoral fishes: current status and prospects for future research. In *Behaviour and Conservation of littoral fishes* (ed. Almada, V. C., Oliveira, R. F. & Goncalves, E. J.), pp. 149-178. Lisbon, ISPA. 1999.
- SCOTT, A. P. AND SORENSEN, P. W. Time course of release of pheromonally active gonadal steroids and their conjugates by ovulatory goldfish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 96, 309-323, 1994.
- SORENSEN, P. W., SCOTT, A. P. AND KIHSLINGER, R. L. How common hormonal metabolites function as relatively specific pheromonal signals in the goldfish. In *Proceedings of the 6th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, Bergen, Norway, July 4-9, 1999* (ed. B. Norberg, O. S. Kjesbu, G. L. Taranger, E. Andersson and S. O. Stefansson), pp. 125-128. Bergen, Norway: Bergen 2000.
- VERMEIRSEN, E. L. M. & SCOTT, A. P. Excretion of free and conjugated steroids in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): evidence for branchial excretion of the maturation-inducing steroid, 17,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one. *Gen. Comp. Endocrinol.* 101, 180-194, 1996.

4.3. Artículo 3

**“RELEASE OF SEX STEROID INTO THE WATER BY FEMALE BROOK
TROUT AND GIANT DANIO AFTER THE INDUCTION OF THE OVULATION”**

M. L. PINILLOS¹, A. P. SCOTT^{1*} AND P.W. SORENSEN²

¹*The Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science, Barrack Road, The
Nothe Weymouth, Dorset, DT4 8UB, U. K.*

²*Department of Fisheries and Wildlife, University of Minnesota, 200 Hodson Hall, St Paul,
MN 55108, U.S.A.*

Author for correspondence:

A. P. Scott, (Fax: +44 (0) 1305 206601; E-mail: a.p.scott@cefas.co.uk)

EN FASE FINAL DE PREPARACIÓN DEL MANUSCRITO

ABSTRACT

In the present study we have established which sex steroids are released into the water by mature females of two species of teleost, the salmonid, brook trout (*Salvelinus fontinalis*), and the cyprinid, giant Danio (*Braquidanio aequipinnatus*), in response to an injection of Ovaprim (a synthetic analogue of gonadotropin releasing hormone plus a dopaminergic inhibitor). After Ovaprim injection, water samples were collected at regular intervals, steroids were extracted and free, sulphated and glucuronidated fractions separated. Radioimmunoassays (RIAs) were performed to measure the sex steroids. In the brook trout, blood samples were also taken. Ovaprim induced the ovulation in 100% of the brook trout at day 9. The concentration of free 17,20 β -P in the plasma of brook trout underwent an increase at the moment of the ovulation. Among the steroids released, it was the 1720 β -P,, which was released, at the highest rate after the injection of Ovaprim. The free forms of the progestagens 17,20 α -P-5 β , 1721-P, 17-P and 17,20 α -P were also released in higher amount after the treatment. In female giant dano the release of 17,20 β -P was also augmented after Ovaprim injection although in a much smaller amount than in brook trout.

Key words: pheromones, reproduction, oocyte maturation, sex steroids, *Salvelinus fontinalis*, *Brachydanio aequipinnatus*

INTRODUCTION

It is well established that pheromones are involved in teleost reproduction (Colombo *et al.*, 1982; Dulka *et al.*, 1987; Poling *et al.*, 2001). The role of these pheromones is the induction of behavioural (spawning behaviour) and physiological responses (oocyte maturation and ovulation in females and spermiation in males), which is conducive to the success of the fertilization. Pheromones have a crucial function at the moment of the final oocyte maturation allowing the synchronization of both sexes.

Previous studies have shown that teleost fish release different sex steroids to the water where they can act as pheromones. The release of free and conjugated steroids into the water has been demonstrated in several teleost species such as *Carassius auratus* (Dulka *et al.*, 1987), *brachydanio rerio* (Van Den Hurk *et al.*, 1987), *Clarias gariepinus* (Van Weerd *et al.*, 1991) and *Trichogaster trichopterus* (Becker *et al.*, 1992). Apart from prostaglandins all teleost sex pheromones have been found to be sex steroids or derivatives (Essington and Sorensen, 1996). The fact that these water borne gonadal steroids trigger a response in conspecifics has been shown in many teleost species, *Gobius joso* (Colombo *et al.* 1982), *Brachydanio rerio* (Van Den Hurk and Lambert, 1983), *Carassius auratus* (Sorensen, 1992).

It has been reported in several teleost species that when the oocyte maturation takes place there is a shift in the steroids biosynthesis in the ovary from the production of C₁₈ (estrogens) and C₁₉ (androgens) to C₂₁ steroids (progestagens) (Nagahama *et al.*, 1986). The progestagen 17 α ,20 β ,dihydroxy-4-pregnen-3-one (17,20 β -P) has been proposed as the maturation inducing steroid in many teleost species (Jalabert, 1976; Goetz, 1983; Yamauchi *et al.*, 1984; Canario and Scott, 1988), which acts directly on the oocyte to initiate the process of oocyte maturation (Nagahama, 1997). Moreover, the 17,20 β -P has also been shown to act like a pheromone in goldfish (Stacey and Sorensen, 1986; Sorensen,

1992). In fact, goldfish represents the best understood model of sex pheromone function. Scott and Sorensen (1994), have demonstrated that ovulating female goldfish release into the water large quantities of a wide variety of free and conjugated steroids, five of which are potential pheromones.

Reproduction in fish is characterized by the wide difference in absolute levels of gonadal steroids found among the different fish groups. During spawning salmonids generally have high plasma concentration of steroids, with peak levels of 17,20 β -P of 400 ng/ml, as in the case of female rainbow trout (*Salmo gairdneri*) (Scott *et al.*, 1982). In contrast cyprinids have low plasma concentration, the same progestagen in the spawning season reaches plasma concentrations of 25 ng/ml in female goldfish (Stacey *et al.*, 1983) and 14 ng/ml in female tench (*Tinca tinca*) (Pinillos *et al.* 2003 in press a). It is known that a number of fish species share the same sex pheromones and then, the species-specific cue is probably strongly determined by the manner in which it is released and encountered (Sorensen *et al.*, 1991).

Our aim was to establish, which steroids are released into the water and the rate of release in females induced to mature from two different teleost species, the salmonid *Salvelinus fontinalis* and the cyprinid *Brachydanio aequipinnatus*. The maturation was induced by the administration of Ovaprim, a mix of a synthetic analogue of the gonadotropin releasing hormone plus a dopaminergic inhibitor.

MATERIALS AND METHODS

Experimental procedure

Salvelinus fontinalis

Female brook trout were purchased from a fish farm and maintained in flow through stock tanks at 12 °C in the laboratory for 3 weeks. Before the treatment, 8 gravid females were selected (215 ± 10 g body weight, mean \pm S.E.M.) and moved from the stock tanks into individual 40 litre aquaria. After 5 hours, a water sample was collected (1000 ml), filtered and steroids were extracted as described below. The fish were then anaesthetised (2PE), bleed and a intraperitoneal injection of 0.15 ml/kg body weight of Ovaprim (a synthetic analogue of gonadotropin releasing hormone, 20 μ g/ml plus a dopaminergic inhibitor, Syndel International Inc.) was administered. After injection fish were placed into the stock tanks. On Days 3, 5, 7, 9 and 11, each fish was placed in a clean 40 litre aquaria for a period of 5 hours after which a water sample was collected and the fish were checked for ovulation. Days 5, 7, 9 and 11 after the water sample collection, the fish were anaesthetised and bleed. Plasma samples were stored at -20°C until the assays were performed.

Brachydanio aequipinnatus

Giant danios were obtained from a commercial supplier and kept in the laboratory for acclimation for two months. Two hours before the fish were to be injected, 8 females were selected, average weight 2.8 g and placed into individual containers filled with 1000 ml dechlorinated water at 27 °C. After this period, a water sample was collected (300 ml) and the fish received an intraperitoneal of 1.5 μ l of Ovaprim. After injection, and after each subsequent sampling time (2, 4, 6, and 8 hours postinjection), each fish was placed in

Free steroids were extracted from 100 μ l of plasma by shaking with 4 ml of diethyl ether. Steroids were extracted from water samples by pumping them through Sep-pak Plus C₁₈ cartridges (Waters Chromatography) as described in detail by Scott and Sorensen (1994). Briefly, the steroids were eluted from the extraction cartridges with 4 ml methanol, which was dried down at 45 °C under a stream of nitrogen and then reconstituted in 200 μ l water. Free steroids were extracted with diethyl ether. Deconjugation of sulfated steroids was carried out by acid solvolysis using a mixture of ethyl acetate and trifluoroacetic acid (TFA), while glucuronidated steroids were deconjugated by enzymatic hydrolysis with β -glucuronidase. Residues from the extractions were redissolved in 1 ml assay buffer (0.05 M sodium phosphate buffer, pH 7.6, containing 0.1% bovine serum albumin and 0.01% sodium azide).

78

Statistics

All data are presented as mean \pm S.E.M. Statistical analyses of plasma steroid concentrations and rate of release were carried out on logarithmically transformed data. An analysis of variance (ANOVA) was applied followed by a Bonferroni's test for multigroup comparisons where time 0 group was compared with each time group.

A probability level of $p < 0.05$ was considered as statistically significant.

RESULTS

Salvelinus fontinalis

On day 9 after the Ovaprim injection, all females yielded eggs. Plasma concentrations of 17,20 β -P increased from 3 ng/ml prior to ovulation to 23 ng/ml at ovulation. In order to determine which steroids were released into the water, pools of water extract were made and aliquots from these pools were then assayed for different steroids. The analysis of steroids in pooled water extracts from female brook trout sampled at day 0 and day 5 revealed that among the steroids tested the T, AD, 17,20 β -P, 17,20 α -P, 17,20 β ,21-P, 17,20 α -P-5 β , 17-P and 17,21-P were released to the water in higher amounts after the treatment with the Ovaprim (Table I). On the basis of these results, these steroids were then measured in individual extracts at all sampling times. Brook trout released the androgens, T and AD into the water after Ovaprim injection, releasing 1.5 times more amount of androstenedione than testosterone (Fig.1). The free form of the 17,20 β -P was the steroid released at the highest rate, reaching values of 1600 ng/h on day 7. Additionally both sulphated and glucuronidated forms of 17,20 β -P were also released although at a much lower rate (Fig. 2). The free progestagens 17,20 α P-5 β , 17,21-P, 17,20 β ,21-P and 17,20 α -P were released in significantly higher amounts on day 7 than on day 0 (Fig. 3).

Brachydanio aequipinnatus

Ovulation occurred in 50% of the fish after 6 h of the administration of Ovaprim. The amount of free and conjugated steroids released in pooled water extracts from female giant danio at 2 h after the Ovaprim injection are presented in the Table II. The 17,20 β -P (free and conjugated form) was the steroid that underwent the highest increase (Fig.4). The amount of E₂ and 17,20 α -P were slightly augmented after the injection although no statistically significant differences were observed. No differences were observed in the rate of release of free 17,20 α -P-5 β whereas the conjugated sulphate was released in significantly higher amount after 6 h of the treatment (Fig. 5).

Brook trout ng/h	Free Steroids					
	Day 0	Day 3	Day 5	Day 7	Day 9	Day 11
T	17	87	140	50	13	9
AD	37	255	248	91	21	
11-KT	8	12	11	7	6	5
E ₂	9	16	12	4	3	nd
17,20 β -P	10	369	345	1425	347	20
17,20 α -P	2	12	12	17	6	3
17,20 β ,21-P	6	13	17	24	17	8
17,20 α -P-5 β	38	210	212	956	220	45
17-P	nd	53	64	72	27	Nd
17,21-P	48	147	174	171	185	46

Brook trout ng/h	Sulfated Steroids					
	Day 0	Day 3	Day 5	Day 7	Day 9	Day 11
T	8	11	13	8	8	8
11-KT	3	5	5	4	5	4
E ₂	nd	nd	nd	nd	nd	nd
17,20 β -P	17	56	46	166	83	15
17,20 α -P	2	4	3	4	3	2
17,20 β ,21-P	10	8	9	12	21	5
17,20 α -P-5 β	32	80	111	112	114	42
17,21-P	18	39	26	26	23	12

Brook trout ng/h	Glucuronidated Steroids					
	Day 0	Day 3	Day 5	Day 7	Day 9	Day 11
T	8	18	11	11	13	4
11-KT	3	5	4	4	3	nd
E ₂	nd	nd	nd	nd	nd	nd
17,20 β -P	5	9	3	22	65	5
17,20 α -P	2	2	nd	2	2	2
17,20 β ,21-P	4	4	3	6	7	3
17,20 α -P-5 β	11	12	11	26	102	10
17,21-P	3	7	7	9	8	7

Table 1. Amount of free and conjugated steroids found in water pool samples where female Brook Trout was held after Ovaprim injection.

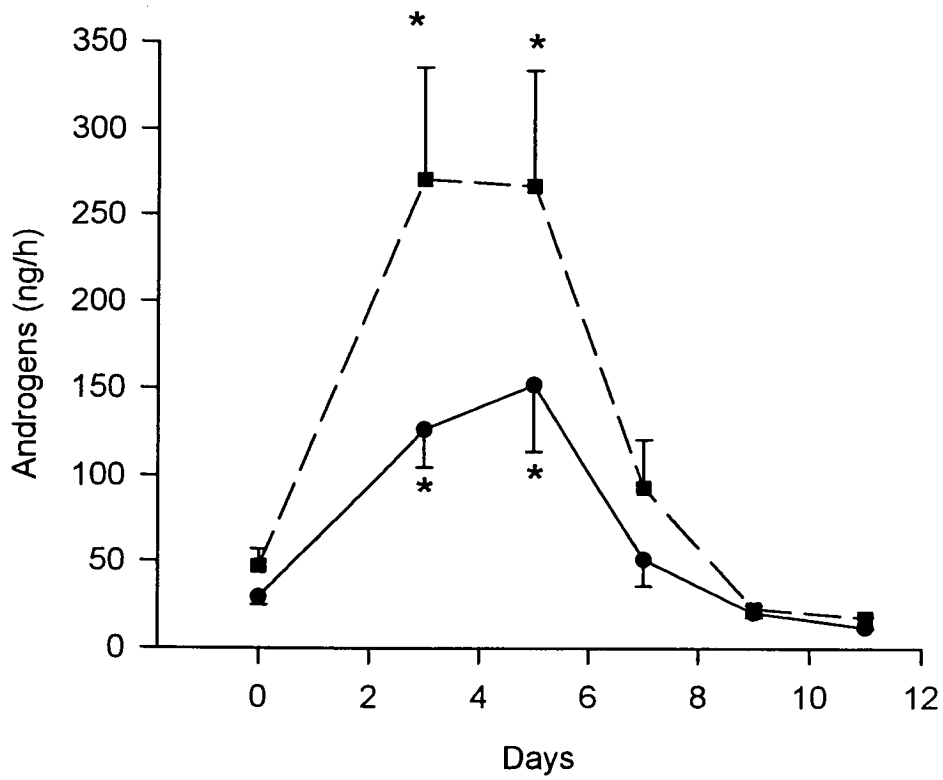


Figure 1. Rates of release (mean \pm S.E.M.) of free testosterone (●) and androstenedione (■) into the water by female Brook trout at different times after treatment with Ovaprim. Asterisks denote significant differences with respect to the day 0 group. ($P < 0.05$)

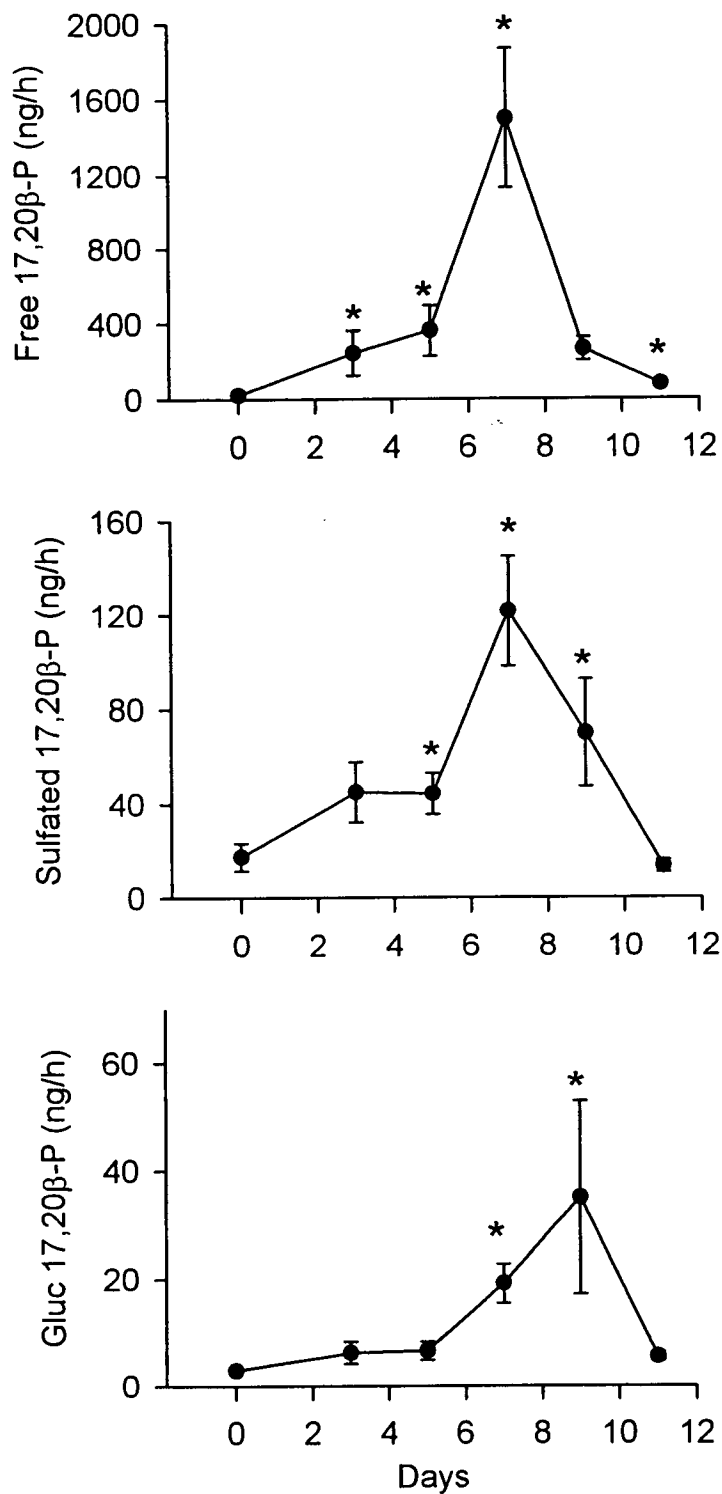


Figure 2. Amounts (mean \pm S.E.M.) of free 17,20 β -P, sulfated 17,20 β -P and glucuronidated 17,20 β -P release to the water by female brook trout after injection of Ovaprim. Asterisks denote significant differences compared to the to the day 0 group. ($P < 0.05$)

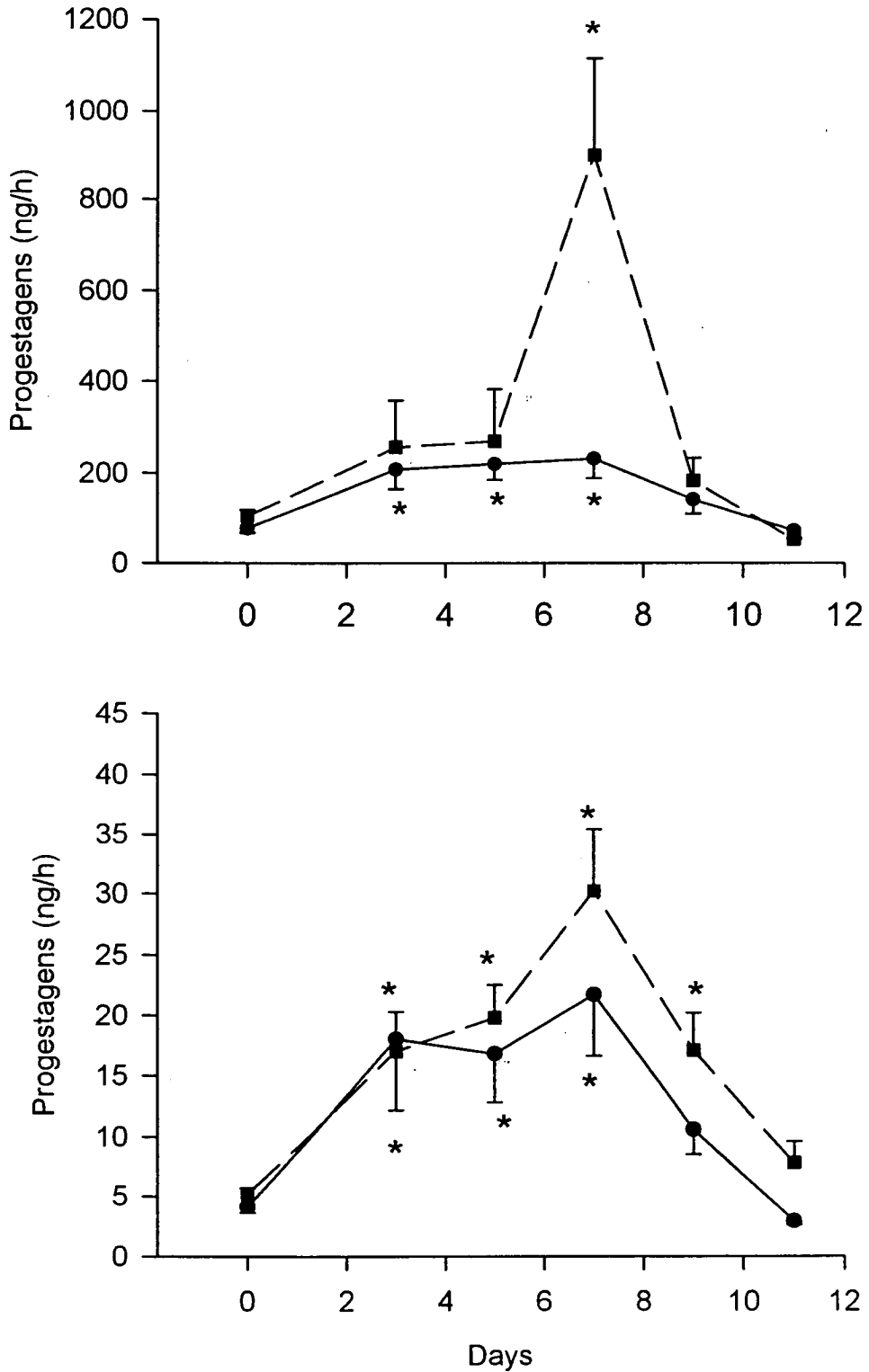


Figure 3. Rates of release (mean \pm S.E.M.) of the free progestagens 17,21-P (●) and 17,20α-P-5β (■) (upper graph) and 17,20α-P (●) and 17,20β,21-P (■) (lower graph) into the water by female brook trout at different times after treatment with Ovaprim. Asterisks denote significant differences with respect to the day 0 group ($P < 0.05$).

Giant Danio ng/h	Free Steroids					
	-2 h	0 h	2 h	4 h	6 h	8 h
T	2	2	2	2	2	2
AD	3	5	5	4	3	2
11-KT	nd	nd	nd	nd	nd	nd
E ₂	1.2	1.2	3.6	2.5	2	1.6
17,20 β -P	3	14	30	18	11	5
17,20 α -P	2	12	12	17	6	3
17,20 β ,21-P	2	3	3	3	3	3
17,20 α -P-5 β	14	13	4	14	7	3
17-P	nd	2	4	nd	nd	nd
17,21-P	45	43	32	30	27	30

Giant Danio ng/h	Sulfated Steroids					
	-2 h	0 h	2 h	4 h	6 h	8 h
T	nd	nd	nd	nd	nd	nd
11-KT	nd	nd	nd	nd	nd	nd
E ₂	nd	nd	nd	nd	nd	nd
17,20 β -P	3	5	13	14	10	10
17,20 α -P	2	4	3	4	3	2
17,20 β ,21-P	2	3	4	4	7	7
17,20 α -P-5 β	2	7	8	10	28	20
17,21-P	3	2	3	5	4	5

Giant Danio ng/h	Glucuronidated Steroids					
	-2 h	0 h	2 h	4 h	6 h	8 h
T	4	2	2	4	4	3
11-KT	nd	nd	nd	nd	nd	nd
E ₂	nd	nd	nd	nd	nd	nd
17,20 β -P	2	7	26	20	14	11
17,20 α -P	2	2	nd	2	2	2
17,20 β ,21-P	5	7	16	17	17	17
17,20 α -P-5 β	2	2	10	9	7	5
17,21-P	1	1	2	2	2	nd

Table II. Amount of free and conjugated steroids (ng/hour) found in water pool samples where female Giant Danio was held after Ovaprim injection

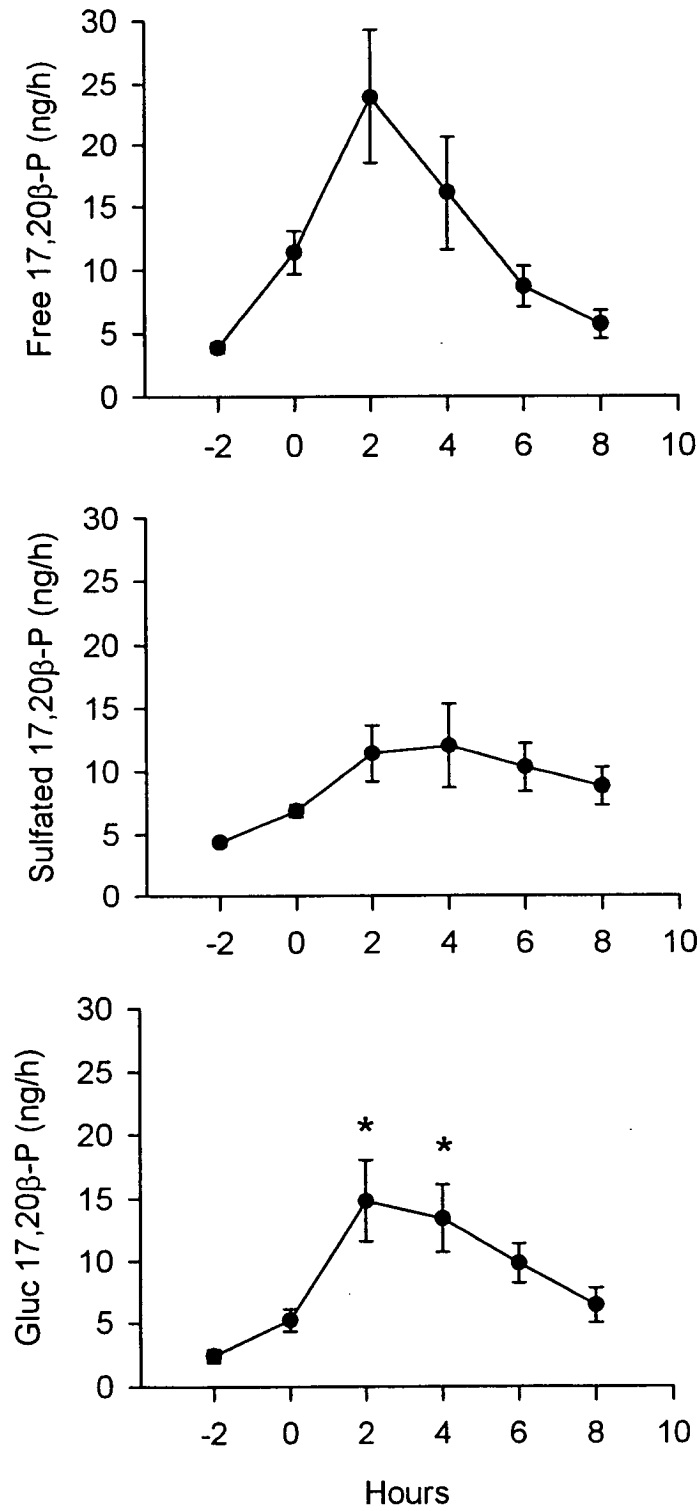


Figure 4. Rates of release (mean ± S.E.M.) of free 17,20β-P, sulphated 17,20β-P and glucuronidated 17,20β-P into the water by female giant danio at different times after Ovaprim injection.

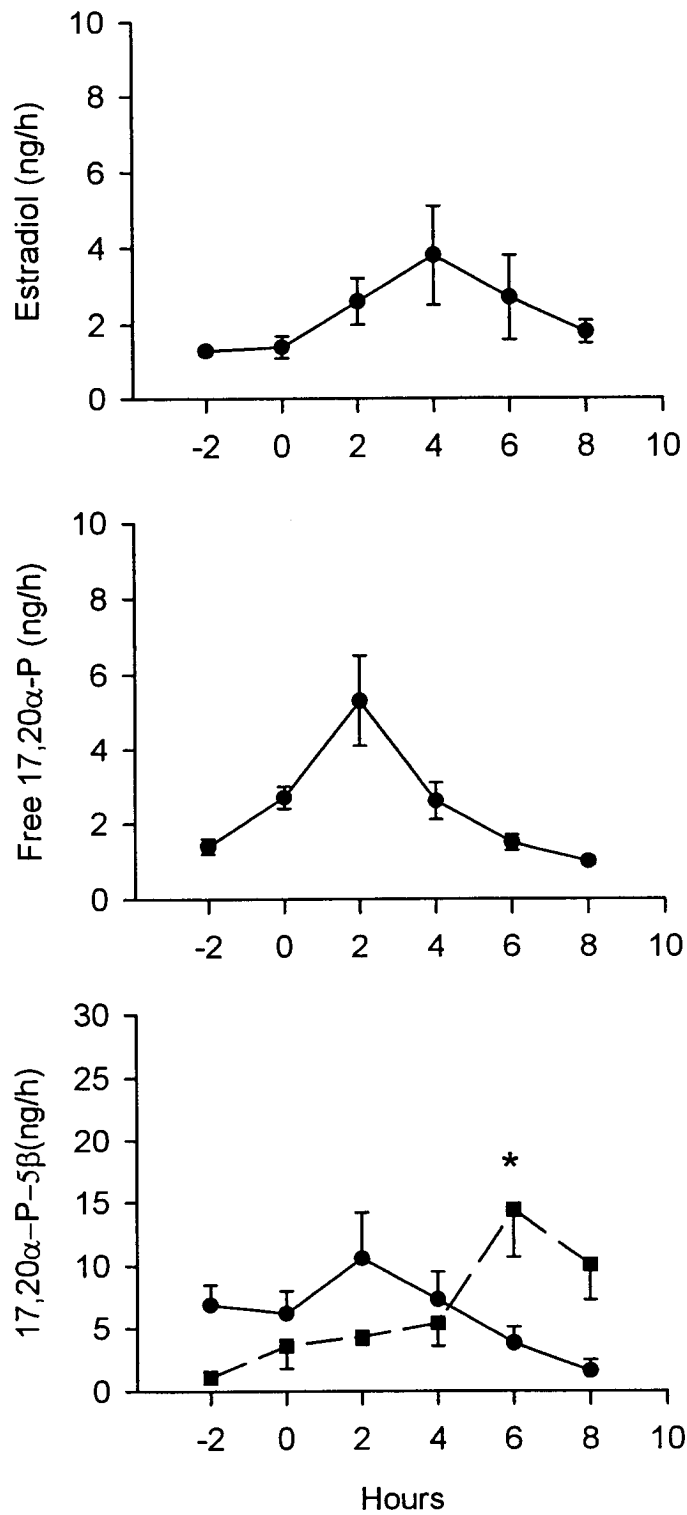


Figure 5. Amounts (mean \pm S.E.M.) of estradiol, free 17,20 α -P and free (●) and sulfated (■) 17,20 α -P-5 β release to the water by female giant danio after injection of Ovaprim.

DISCUSSION

The present study provides data on the rate of release of sex steroids into the water after the induction of the oocyte maturation in two species of teleost; a salmonid, *Salvelinus fontinalis* and a cyprinid, *Brachydanio aequipinnatus*. In both species studied, the amount of steroid released was higher after the administration of Ovaprim.

In addition, we observed that Ovaprim is a useful tool to induce oocyte maturation in female brook trout, inducing ovulation in a 100% of the fish. In the case of the cyprinid giant danio just 50% of fish ovulated during the course of our study. Ovaprim contains an analogue of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) plus a dopaminergic inhibitor. GnRH is the hormone that promotes the release of gonadotropin from the pituitary (Kobayashi *et al.* 1989), which in turn stimulates the production of steroids by the gonads (Yoshikuni and Nagahama 1991), whereas dopamine is known as the main inhibitor of gonadotropins release (Peter *et al.*, 1986). The differences in the percentage of females that ovulated in each group could be due to the brook trout being in a more advance stage of maturity than giant danio. Also, it could be possible that in the case of giant danio, dopamine may have a weak inhibitory activity and induction of maturation could be achieved, as in many other teleost species (Crim *et al.*, 1987), using the GnRH analog without the dopamine inhibitor.

In brook trout, ovulation took place on day 9 after the administration of Ovaprim. The assay of holding water extract from brook trout established that, the highest amount of androgens released was observed on days 3 and 5. By day 9 androgens were not found in the water. Progestagens underwent the peak rate of release on the day 7. As has already been discussed for other teleost species, there is a direct consequence of the shift on the steroidogenesis in the ovary from C₁₉ and C₁₈ steroids to C₂₁ steroids (Nagahama *et al.* 1986). In response to GtH stimulation the 17-P is converted into C₂₁ steroids rather than

into C₁₉ steroids (Scott *et al.* 1983).

The amount of AD released into the water by female brook trout after the treatment was almost double than that of T. AD is also released by female goldfish early in the ovulatory cycle (Scott and Sorensen, 1994), and it has been suggested that its role would be to inhibit courtship behaviour, preventing inappropriate reproductive interaction (Poling *et al.*, 2001).

The steroid released in a highest rate for female brook trout after Ovaprim injection was the free form of 17,20 β -P. Both 17,20 β -P conjugates were also released although at lower rate than the free form. It has been established that in salmonids this C₂₁ steroid induces oocyte maturation in females (Nagahama and Adachi, 1985) and spermiation in males (Miura *et al.* 1992). On the other hand, Essington and Sorensen (1996), demonstrated that brook trout could smell sulphated 17,20 β -P and that they did not detect the free and glucuronidated forms. More studies have to be done in order to elucidate if sulphated 17,20 β -P provoke any behavioural and/or physiological response and if it is detected by the olfactory epithelium of conspecifics. It is possible, that similar to other teleost species, this progestagen would have a pheromonal role in brook trout.

For brook trout 17,20 β ,21-P was present on day 7, however, the amount of release was much lower than that of 17,20 β -P. The 17,20 β ,21-P is equipotent with 17,20 β -P in bringing about oocyte final maturation *in vitro* in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, Walbaum (Canario and Scott, 1988). As has been suggested for other teleost species both steroids could function as the maturation-inducing hormone in brook trout (Zairin *et al.*, 1992). No data concerning the olfactory sensitivity of this steroid in brook trout have been found. The release of 17,21-P, precursor of the steroid 17,20 β ,21-P was also increased during the days 3, 5 and 7. These steroids are also released by the cyprinids, roach (Lower *et al.*, 2000) and goldfish (Scott and Sorensen, 1994).

High amounts of 17,20 α -P-5 β are released for brook trout, this steroid has been found in the plasma of several teleosts (Canario and Scott, 1989), reduction makes the steroid more water soluble and thus easier to excrete.

As has been observed for some cyprinids, female brook trout released 17,20 α -P into the water. Although 17,20 α -P has been shown to give an EOG response in at least one cyprinid (Stacey and Cardwell, 1995), its biological role remains unknown (Scott and Sorensen, 1994; Ebrahimi *et al.*, 1996). Its presence is more likely to reflect the ubiquity of 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase (HSD) activity in different tissues (Ebrahimi *et al.*, 1996).

In giant danio, as has been observed in other cyprinids the time of ovulation after the treatment with Ovaprim is short. We observed that, ovulation took place 6 h after the pharmacological induction of the maturation whereas in tench it occurred after approximately 18 h (Pinillos *et al.*, 2003b), and in goldfish between 15 and 18 h (Scott and Sorensen, 1994). The analysis of steroids concentrations in pooled extracts from the female brook trout did not show a difference in the androgens released after the Ovaprim treatment, therefore we did not evaluate the androgens at any of the sampling times. The steroid that underwent the greatest increase after the injection was 17,20 β -P (free and conjugated). Female goldfish also releases this steroid, although the peak rate of release of all the forms of the steroid was more than double in goldfish than in the case of giant danio. We observed that giant danio released 17,20 α -P in much smaller amount than in goldfish.

In general, the amount of sex steroids released for female giant danio after Ovaprim injection is lower than those released by female goldfish, as we have observed from the analysis of steroids taken from the pooled water samples. Although giant danio and goldfish belong to the cyprinidae family there are remarkable differences in which steroids

are released and in the amount that is released. This could give to the blend of steroids released a specificity which would enable different species to distinguish the signal of its conspecific.

More studies need to be done in order to elucidate if the steroids which are released to the water at the moment of the ovulation for these two species of teleost, are acting as pheromones.

REFERENCES

- Becker, D., Galili, N. and Degani, G. (1992). GCMS-identified steroids and steroid glucuronides in gonads and holding water of *Trichogaster trichopterus* (Anabantidae, Pallas 1770). *Comp. Biochem. Physiol. B* 103, 15-19.
- Canario, A.V.M. and Scott, A.P. (1988). Structure-activity relationships of C21 steroids in an in vitro oocyte maturation bioassay in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 71, 338-348.
- Canario, A.V.M. and Scott, A.P. (1989). Synthesis of 20 α -hydroxylated steroids by ovaries of the dab (*Limanda limanda*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 76, 147-158.
- Colombo L., Belvedere P.C., Marconato A. and Bentivegna F. (1982). Pheromones in teleost fish. In "*Proceedings of the Second International Symposium on Reproductive Physiology of Fish*" pp. 89-94. (Richter C. J. J. and Goos H.J. Th., compilers). Wageningen, The Netherlands
- Crim, L. W., Peter, R.E. and Van Der Kraak, G. (1987). The use of LHRH analogs in aquaculture. In "*LHRH and its analogs: contraceptive and therapeutic application*", part II. pp. 489-498. (Vickery, B.C., Nestor, J.J., Jr, eds) MTP Press, Lancaster,
- Dulka, J.G., Stacey, N.E., Sorensen, P.W. and Van Der Kraak, G.J. (1987). A steroid sex pheromone synchronizes male-female spawning readiness in goldfish. *Nature* 325, 251-253.
- Ebrahimi, M., Scott, A.P. and Kime, D.E. (1996). Extragonadal production of 17,20-dihydroxy-4-pregnen-3-ones in vitro in cyprinid fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 104, 296-303.
- Essington, T.E. and Sorensen, P.W. (1996). Overlapping sensitivities of brook trout and brown trout to putative pheromones. *J. Fish Biol.* 48, 1027-1029.

- Goetz, F.W. (1983). Hormonal control of oocyte final maturation and ovulation in fishes. In "*Fish Physiology*" Vol. IXA pp. 117-170. (W.S. Hoar, D.J. Randall and E.M. Donaldson, eds). Academic Press, New York.
- Jalabert, B. (1976). In vitro oocyte maturation and ovulation in rainbow trout (*Salmo gairdneri*), northern pike (*Esox lucius*) and goldfish (*Carassius auratus*). *J. Fish. Res. Board Can.* 33, 974-988.
- Kobayashi, M., Aida, K. and Hanyu, I. (1989). Induction of gonadotropin surge by steroid hormone implantation in ovariectomized and sexually regressed female goldfish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 73, 469-476.
- Lower N.J., Scott A.P. and Moore A. (2000). Release of sex steroids into the water by roach (*Rutilus rutilus*). In "*Proceedings of the Sixth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish*" pp. 198. (Norberg, B., Kjesbu, O.S., Taranger, G.L., Andersson, E. & Stefasson, S.O. eds.) Bergen.
- Miura, T., Yamauchi, K., Takahashi, H and Nagahama, Y. (1992). The role of hormones in the acquisition of sperm motility in salmonid fish. *J. Exp. Zool.* 261, 359-363.
- Moore, R.K., Scott, A.P. and Collins, P.M. (2000). Circulating C-21 steroids in relation to reproductive condition of a viviparous marine teleost, *Sebastes rastrelliger* (Grass Rockfish). *Gen. Comp. Endocrinol.* 117, 268-280.
- Nagahama, Y. (1997). 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one, a maturation-inducing hormone in fish oocytes: mechanisms of synthesis and action. *Steroids* 62, 190-196.
- Nagahama, Y. and Adachi, S. (1985). Identification of maturation-inducing steroid in a teleost, the amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*). *Dev. Biol.* 109, 428-435.
- Nagahama, Y., Goetz, F.W. and Tan, J.D. (1986). Shift in steroidogenesis in the ovarian follicles of the goldfish (*Carassius auratus*) during gonadotropin-induced oocyte maturation. *Dev. Growth Differ.* 28, 555-561.

- Peter, R.E., Chang, J.P., Nahorniak, C.S., Omeljaniuk, R.J., Sokolowska, M., Shih, S.H. and Billard, R. (1986). Interactions of catecholamines and GnRH in regulation of gonadotropin secretion in teleost fish. *Recent Prog. Horm. Res.* 42, 513-548.
- Pinillos, M.L., Delgado, M.J. and Scott, A.P. (2003a). Seasonal changes in plasma gonadal steroid concentrations and gonadal morphology of male and female tench (*Tinca tinca*, L.). *Aquac. Res.* In press.
- Pinillos, M.L., Guijarro, A.I., Delgado, M.J., Hubbard, P.C., Canário, A.V.M. and Scott, A.P. (2003b) Production, release and olfactory detection of sex steroids by the tench (*Tinca tinca* L.). *Fish Physiol. Biochem.* In press.
- Poling, K.R., Fraser, E.J. and Sorensen, P.W. (2001). The three steroidal components of the goldfish preovulatory pheromone signal evoke different behaviours in males. *Comp. Biochem. Physiol. B* 129, 645-651.
- Scott, A.P. and Sorensen, P.W. (1994). Time course of release of pheromonally active gonadal steroids and their conjugates by ovulatory goldfish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 96, 309-323.
- Scott, A.P., MacKenzie, D.S. and Stacey, N.E. (1984). Endocrine changes during natural spawning in the white sucker, *Catostomus commersonii* II. Steroid hormones. *Gen. Comp. Endocrinol.* 56, 349-359.
- Scott, A.P., Sumpter, J.P. and Hardiman, P.A. (1983). Hormone changes during ovulation in the rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Gen. Comp. Endocrinol.* 49, 128-134.
- Scott, A.P., Sheldrick, E.L. and Flint, A.P.F. (1982). Measurement of 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one in plasma of trout (*Salmo gairdneri* Richardson): seasonal changes and response to salmon pituitary extract. *Gen. Comp. Endocrinol.* 46, 444-451.

- Sorensen, P. W. (1992). Hormones, pheromones and chemoreception. In: "Fish Chemoreception" pp. 199-228. (T. J. Hara, ed.) Chapman and Hall, London.
- Sorensen, P.W., Hara, T.J. and Stacey, N.E. (1991). Sex pheromones selectively stimulate the medial olfactory tracts of male goldfish. *Brain Res* 558, 343-347.
- Stacey, N.E. and Cardwell, J.R. (1995). Hormones as sex pheromones in fish: widespread distribution among freshwater species. In "Proceedings of the Fifth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish" pp. 244-248. (Goetz, F. W. and Thomas, P., eds.), Austin, Texas.
- Stacey, N.E. and Sorensen, P.W. (1986). 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one: A steroidal primer pheromone increasing milt volume in the goldfish, *Carassius auratus*. *Canad. J. Zool.* 64: 2412-2417.
- Stacey, N.E., Peter, R.E., Cook, A.F., Truscott B., Walsh, J. and Idler, D.R. (1983) Changes in plasma concentration of gonadotropin, 17 β -estradiol, testosterone and 17 α -hydroxy-20 β -dihydroprogesterone during spontaneous and brain lesion induced ovulation in goldfish. *Can. J. Zool.* 61, 2646-2652.
- Van Den Hurk, R. and Lambert, J.G.D. (1983). Ovarian steroid glucuronides function as sex pheromones for male zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Can. J. Zool.*, 61, 2381
- Van Den Hurk, R., Schoonen, W.G.E.J., Van Zoelen, G.A. and Lambert, J.G.D. (1987). The biosynthesis of steroid glucuronides in the testes of the zebrafish, *Brachydanio rerio*, and their pheromonal function as ovulation inducers. *Gen. Comp. Endocrinol.* 68, 179-188.
- Van Weerd, J.H., Sukkel, M., Lambert, J.G.D. and Richter, C.J.J. (1991). GCMS-identified steroids and steroid glucuronides in ovarian growth stimulating holding water from adult African catfish, *Clarias gariepinus*. *Comp. Biochem. Physiol. B* 98, 303-311.

- Yamauchi, K., Kagawa, H., Ban, M., Kasahara N. and Nagahama, Y. (1984). Changes in plasma estradiol-17 β and 17 α ,20 β -dihidroxy-4-pregnen-3-one levels during final oocyte maturation of the masu salmon, *Oncorhynchus rhodurus*. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 50, 2137.
- Yoshikuni, M. and Nagahama, Y. (1991). Endocrine regulation of gametogenesis in fish. *Bull. Inst. Zool. Aca. Sinica* 16, 139-172.
- Zairin, M., Asahina, K., Furukawa, K. and Aida, K. (1992). Plasma steroid hormone profiles during HCG induced ovulation in female walking catfish *Clarias batrachus*. *Zool. Sci.* 9, 607-617.

5. Capítulo III

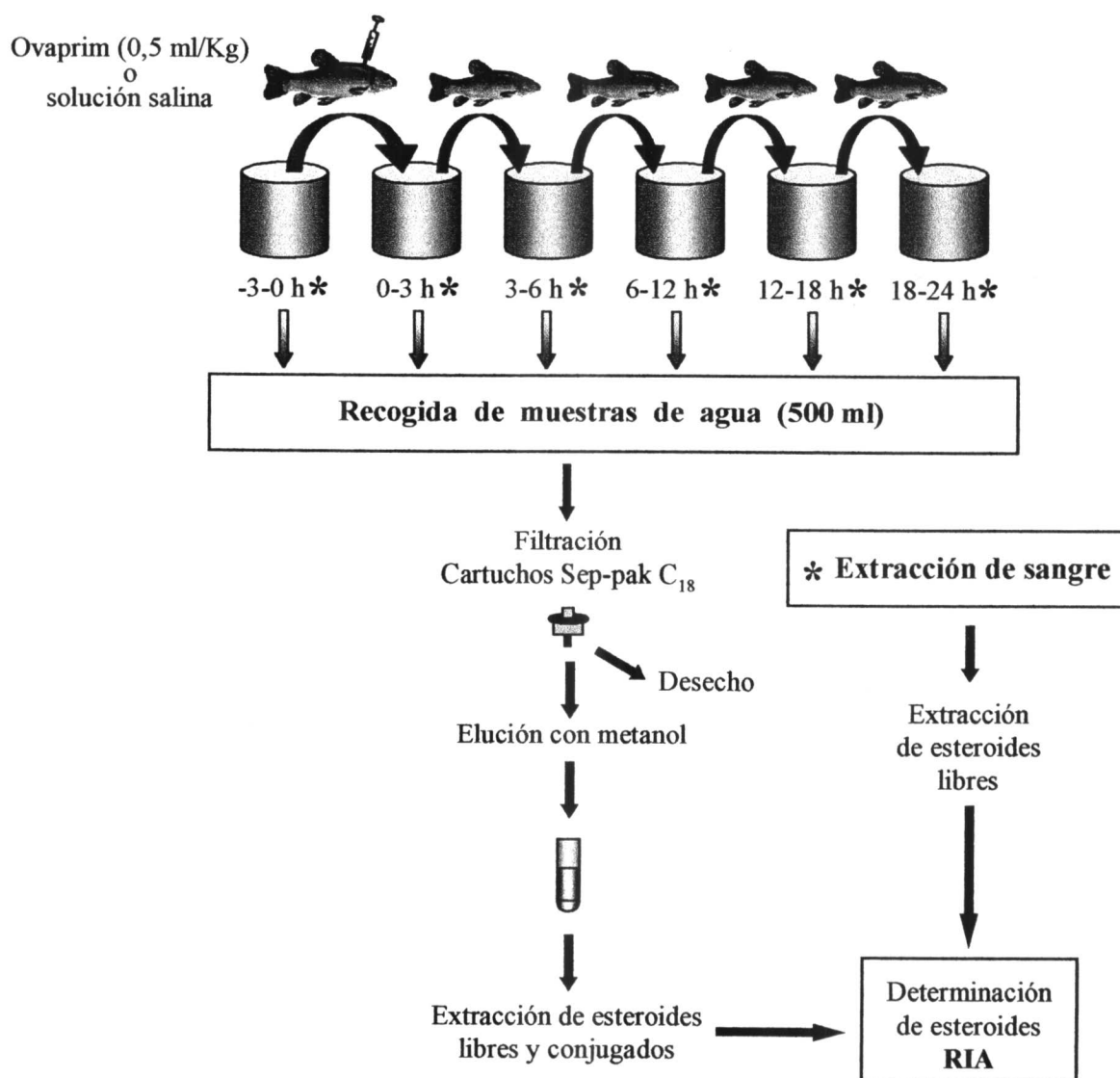
“Liberación de esteroides sexuales al agua por la tenca.
Registro de la detección de dichos esteroides mediante electro-olfatograma”

5.1. Objetivos y diseño experimental

Como vimos en el primer capítulo de esta Memoria, en el plasma del ciprínido *Tinca tinca* encontramos variaciones estacionales en las concentraciones plasmáticas de los siguientes esteroides sexuales: 17β -estradiol, testosterona, androstenediona, $17,20\beta$ -dihidroxi-4-pregnen-3-ona, $17,20\alpha$ -dihidroxi-4-pregnen-3-ona y $17,20\beta,21$ -trihidroxi-4-pregnen-3-ona. Concretamente, durante los meses de primavera y verano las concentraciones plasmáticas de dichos esteroides se encuentran significativamente elevadas. No obstante, puede argumentarse que la conexión entre estas altas concentraciones circulantes de esteroides y la reproducción estacional podría ser meramente circunstancial. Por tanto, y profundizando en el objetivo general de lograr un conocimiento lo más amplio posible de la endocrinología reproductora de la tenca, consideramos necesario establecer si la producción de dichos esteroides puede ser estimulada con la administración de un análogo de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). Dada la relevancia del proceso de maduración final del ovocito, pretendemos investigar los posibles cambios en los esteroides sexuales asociados a la maduración del folículo ovárico y la oviposición.

Para ello, en una primera aproximación (artículo 4) se indujo, en tencas sexualmente maduras, la maduración final del ovocito mediante la administración de GnRH, recogiénose en intervalos prefijados muestras de sangre en las que se valoró la concentración plasmática de distintos esteroides sexuales. Una vez obtenida esta información, la siguiente cuestión que nos planteamos fue determinar si alguno de los esteroides cuantificado en el plasma era liberado al agua. Para ello, realizamos un segundo bloque de experimentos en los que, además de valorar las variaciones que se producen en la concentración plasmática de esteroides sexuales en el momento de la maduración, nos planteamos investigar cuáles de estos esteroides, y en que cantidad, eran liberados al agua por la tenca en el momento de la oviposición. Utilizamos ejemplares sexualmente maduros de ambos sexos, generosamente donados por el “Centro de Acuicultura, Piscifactoría Vegas del Guadiana” (Badajoz), a los que se les indujo la maduración final del ovocito con Ovaprim. Antes de recibir el tratamiento hormonal, los peces se mantuvieron durante 3 horas en acuarios individuales (20 l de agua), periodo tras el cual se extrajo una muestra de sangre de la vena caudal y se recogía una muestra de agua (500 ml). A continuación se administra a los peces inyecciones intramusculares de Ovaprim (o, alternativamente, de solución salina a los controles). Los peces se situaban, nuevamente, en acuarios

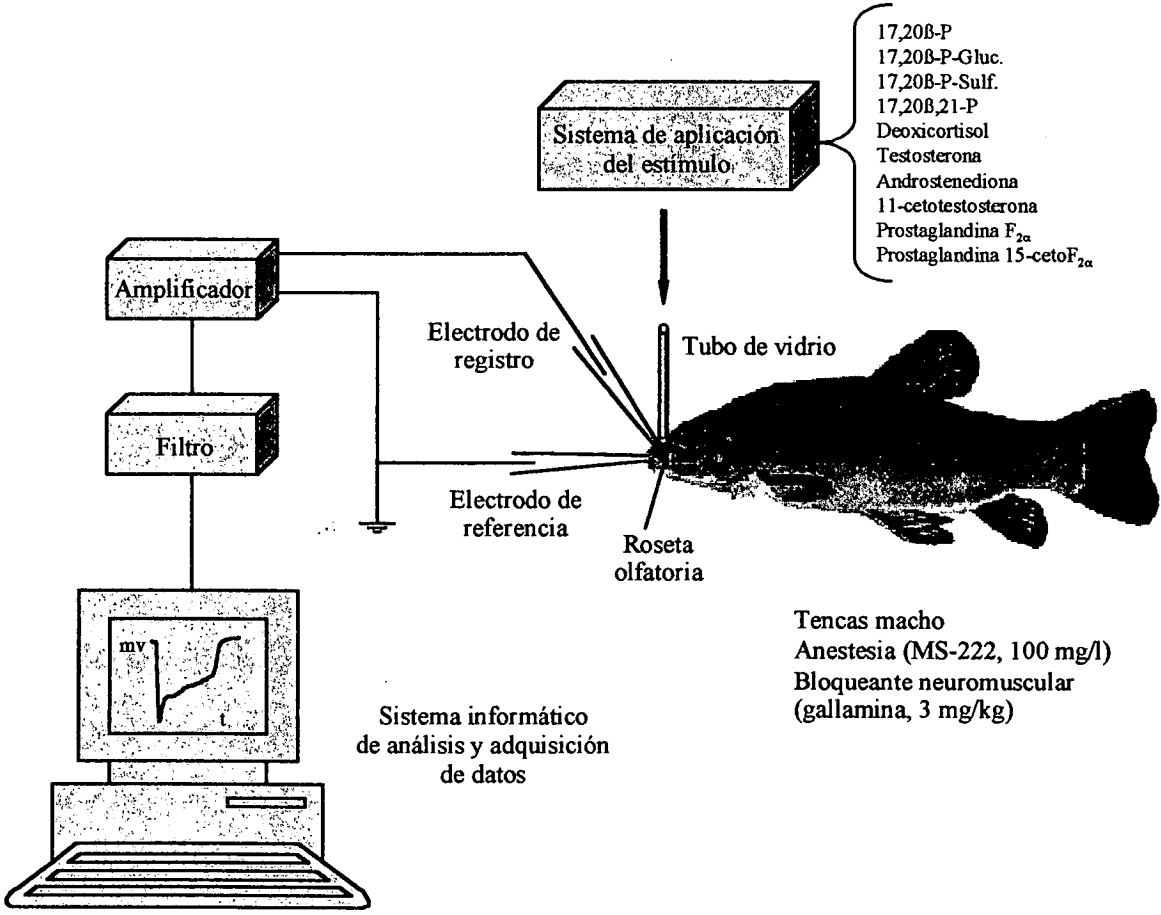
individuales, siendo desplazados a sucesivos acuarios con agua renovada donde permanecían durante los siguientes intervalos de tiempo: 0-3, 3-6, 6-12, 12-18 y 18-24 h. Las extracciones de sangre y la recogida de muestras de agua (500 ml) se realizaron en todos los intervalos indicados (véase el Esquema 9). Las muestras de agua se bombean inmediatamente a través de cartuchos “Sep-pak plus C₁₈” Los cartuchos donde quedaban los esteroides retenidos eran sellados y congelados a -80°C hasta su posterior procesamiento en el laboratorio. Tras la separación de las fracciones libre, sulfatada y glucuronidada (en el plasma sólo se separó la fracción libre) se realizó la valoración de los esteroides por radioinmunoensayo.



Esquema 9. Diseño experimental para la valoración de las variaciones plasmáticas de esteroides sexuales y en su liberación al agua tras la inducción de la maduración.

Una vez caracterizado el patrón de producción de esteroides durante la maduración final del ovocito en la tenca, nuestro siguiente objetivo ha sido tratar de dilucidar si alguno de estos esteroides podría actuar como señal olfatoria que pueda ser detectada por individuos de la misma especie. Es decir, pretendemos investigar si alguno de estos esteroides forma parte del sistema feromonal en la tenca (artículo 5). Como hemos indicado previamente, en el apartado 1.5. de la introducción general, en muchas especies de teleósteos las feromonas sexuales son el regulador principal de las últimas etapas del ciclo reproductor, siendo las responsables de la inducción de respuestas endocrinas y comportamentales. En la bibliografía no existe ningún dato previo relativo a esta cuestión en la tenca. Sin embargo, es importante averiguar si alguno de estos esteroides sexuales es utilizado como mensaje feromonal, lo que conferiría a la tenca una especificidad de especie, aspecto de gran relevancia cuando poblaciones de especies relacionadas habitan en el mismo ambiente y utilizan estrategias reproductoras similares, como de hecho sucede en muchos ciprínidos.

Mediante el registro de la actividad olfatoria, utilizando medidas electrofisiológicas, nos propusimos descubrir que esteroides de los que eran liberados al agua por las tencas hembras en el momento de la maduración, y a qué concentración, pueden ser detectados por las tencas macho. Así mismo, el estudio se diseñó con el objetivo de ensayar si la tenca es capaz de dar una respuesta electro-olfatográfica a ciertas prostaglandinas, a las que peces pertenecientes a un amplio intervalo de grupos taxonómicos son altamente sensibles. En este estudio se emplearon tencas machos adultos generosamente donadas por el “Centro de Acuicultura, Piscifactoría Vegas del Guadiana” (Badajoz). El procedimiento detallado está descrito en el apartado de material y métodos del artículo 5 presentado en esta Memoria. Brevemente, (Esquema 10) tras anestesiar (MS-222) e inmovilizar (gallamina, bloqueante neuromuscular) a los peces, se colocaban en unos soportes, donde las branquias reciben un aporte constante de agua que contiene la solución de anestésico. Colocamos el electrodo de registro en el epitelio olfatorio y un electrodo de referencia en la piel de la cabeza. La fosa nasal derecha es irrigada constantemente con agua desclorada a través de un tubo de vidrio por donde, mediante un sistema informatizado de apertura de una válvula, se aplica el estímulo olfatorio durante un periodo de diez segundos. Tras amplificar y filtrar la señal de voltaje, ésta era digitalizada y grabada. La amplitud de la respuesta a las distintas soluciones de esteroides y prostaglandinas se midió en milivoltios y los umbrales de detección se estimaron por medio de una regresión lineal de las curvas dosis-respuesta a los distintos estimulantes



Esquema 10. Sistema de detección de la sensibilidad olfatoria mediante electro-olfatograma en machos de *Tinca tinca*.

5.2. Artículo 4

**“CHANGES IN PLASMA AND WATER SEX STEROID CONCENTRATIONS IN
MALE AND FEMALE TENCH *TINCA TINCA* IN RESPONSE TO INJECTION OF
GONADOTROPIN-RELEASING HORMONE”**

M. L. Pinillos^{1,2}, A. I. Guijarro², M. J. Delgado² and A. P. Scott^{1*}

¹*The Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science, Barrack Road, The
Nothe, Weymouth, Dorset, DT4 8UB, U. K.*

²*Departamento de Biología Animal II (Fisiología Animal), Facultad de Biología,
Universidad Complutense, 28040 Madrid. Spain.*

**Author for correspondence:*

A.P. Scott (Fax: +44 (0) 1305 206601; E-mail: a.p.scott@cefas.co.uk)

Key words: pheromones, reproduction, spawning, sex steroids, cyprinid

ENVIADA A: FISH PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY

ABSTRACT

It has been shown in several teleosts that, during the spawning season, both males and females release sex steroids into the water, and that some of these steroids behave as pheromones. The present study was carried out to, firstly, establish the types and amounts of steroids that were produced by sexually mature male and female tench (*Tinca tinca*, L.) which had been treated with gonadotropin releasing hormone analogue (GnRHa) and, secondly, to establish which if any were released into the water. Radioimmunoassays (RIAs) were used to measure the steroids and all samples were processed for the measurement of free, sulphated and glucuronidated fractions. The RIAs were for steroids which have been found in other cyprinids: testosterone (T), 17 β -oestradiol (E₂), androstenedione (AD), 11-ketotestosterone (11-KT), 17,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (17,20 β -P), 17,20 α -dihydroxy-4-pregnen-3-one (17,20 α -P) and 17,20 β ,21-trihydroxy-4-pregnen-3-one. In females, free 17,20 β -P, 17,20 α -P, T and AD in plasma showed the largest increases in response to injection with GnRHa or Ovaprim (a mixture of GnRHa and a dopamine inhibitor). Free 17,20 β -P and 17,20 α -P were also released into the water at the greatest rate. Plasma concentrations of the two conjugated forms of 17,20 β -P were also elevated 18 h after the administration of GnRHa, but not by as much as the free steroid. In males, AD and 11-KT showed the greatest increase in response to GnRHa and were moreover released at a higher rate in the treated group than in the control.

ABBREVIATIONS

AD; androstenedione, 17,20 α -P; 17,20 α -dihydroxy-4-pregnen-3-one, (17,20 β -P), 17,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one, GnRH; gonadotropin-releasing hormone, GnRH α ; gonadotropin-releasing hormone analogue, 11-KT; 11-ketotestosterone, RIA; radioimmunoassay, SSBP; sex steroid binding protein, testosterone (T), 17 β -oestradiol (E₂),

INTRODUCTION

The processes of oocyte final maturation, ovulation, spermiation and spawning in fish are controlled by a variety of endogenous and environmental signals. The primary neuroendocrine stimulant is gonadotropin-releasing hormone (GnRH; Peter et al. 1986) which promotes the release of gonadotropin from the pituitary (Kobayashi et al. 1989), which in turn stimulates the production of steroids by the gonads (Yoshikuni and Nagahama 1991). Research has shown that these steroids may have roles as either hormones or sex pheromones (or even as both).

Among the steroids with well-established hormonal roles are: 17β -oestradiol (E_2) which induces vitellogenesis in females (Wallace 1985); testosterone (T), which induces gonadotropin synthesis by the pituitary gland (Crim et al. 1981); 11-ketotestosterone (11-KT), which is the male androgen in teleosts (Billard et al. 1982) and $17,20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one ($17,20\beta$ -P) and $17,20\beta,21$ -trihydroxy-4-pregnen-3-one ($17,20\beta,21$ -P), both of which induce oocyte final maturation (Canario and Scott 1990).

Among the steroids with a pheromonal role, there are only two which are well-established (Stacey and Cardwell 1997) – and those are $17,20\beta$ -P and $17,20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one 20-sulphate, which are both produced by female goldfish, *Carassius auratus*, at the time of ovulation (Sorensen et al. 1995) and have a positive priming effect on plasma gonadotropin concentrations and sperm production in males (Stacey and Sorensen 1986; Sorensen et al. 1995). There are, however, many other gonadal steroids that fish are able to smell and which may therefore be sex pheromones (Stacey and Cardwell 1997). They include: androstenedione (AD), which appears to have an anti-priming effect in male goldfish (Stacey et al. 1991); T, which is detected by olfactory receptors of male Atlantic salmon, *Salmo salar*, parr (Moore and Scott, 1991) and $17,20\alpha$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one ($17,20\alpha$ -P), which is detected by olfactory receptors of at least

one cyprinid fish of the sub-family Danioninae (Stacey and Cardwell 1995).

The ability of a fish to smell a particular steroid is not sufficient evidence that it is a pheromone. Apart from proving that the fish respond either physiologically or behaviourally to the steroid when it is added to the water, it is necessary to prove that the fish can synthesise the steroid and can then also release it into the water (see Stacey and Cardwell 1997).

It has already been shown that E_2 , T, AD, $17,20\beta$ -P, $17,20\alpha$ -P and $17,20\beta,21$ -P are present in the plasma of male and female tench (Pinillos et al. 2003a) and that concentrations are significantly higher in fish sampled during the spring and summer than in the autumn or winter. Since the link between high steroid concentrations and reproduction (which takes place in the summer) might be circumstantial, it was considered necessary to establish whether steroid production could be enhanced by injection of males and females with GnRH. This was the first aim of the present study.

The second aim of the study was to determine which if any of these steroids might be released into the water. In fish, as in mammals, steroids are metabolised in the liver and excreted via the bile or urine (Smith 1973). However, in fish, there is an alternative route – the gills (Maren et al. 1968; Vermeirssen and Scott 1996). This route appears to be open to free steroids (i.e. those steroids which are not conjugated via a hydroxyl group to either glucuronic acid or sulphuric acid (Scott and Vermeirssen 1994; Sorensen et al. 2000). The release of free and conjugated steroids into the water has already been demonstrated in goldfish (Dulka et al. 1987; Scott and Sorensen 1994; Sorensen et al. 2000), *Danio rerio* (Van Den Hurk et al. 1987), *Clarias gariepinus* (Van Weerd et al. 1991), *Trichogaster trichopterus* (Becker et al. 1992) and *Dentex dentex* (Greenwood et al. 2001).

The tench is a multispawning cyprinid that has a widespread distribution in Europe. It spawns from May to July and the eggs are laid in two to three batches with intervals of

up fourteen days between. This species has increased in economic importance as a result of an increase in popularity for human consumption. Therefore this cyprinid is currently one of the most important species in European pond fish farming (Pérez-Regadera 1997).

MATERIALS AND METHODS

Injection of GnRHa

In April 1999, sexually mature adult female and male tench were obtained from the fish farm "Vegas del Guadiana" in Badajoz, Spain, where they were maintained in outside earth ponds under natural conditions. One day before the injection, eleven females and eleven males (830 ± 36 and 557 ± 19 g body weight, mean \pm S.E.M. respectively) were caught and taken indoors. Fish were kept separately according to their sex in two circular aquaria of 1.36 m diameter by 0.5 m high, containing 700 l of aerated and filtered freshwater at 23 °C. After the animals were weighed, they received a dorsal intramuscular injection of gonadotrophin releasing hormone analogue, GnRHa (des-Gly¹⁰, [D-Ala⁶]-LHRH Ethylamide, Sigma, St Louis, MO). The dose was 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ in a volume of 1 ml kg^{-1} of saline. Blood samples were withdrawn by cardiac puncture at 0, 3, 6, 12, 18, 24 and 48 h after the administration of GnRHa. Blood samples were centrifuged at 5000 g for 5 min and plasma was removed and stored at -20 °C until required for RIA.

Injection of ovaprim

In June 2000, sexually mature female and male tench (205 ± 18 and 121 ± 3 g body weight, mean \pm S.E.M. respectively) were obtained from the same fish farm and were maintained under the same conditions as described above. Three hours before the fish were to be injected, they were placed in individual polyethylene bags filled with 20 l dechlorinated water. After this period, a water sample was collected (500 ml) and a blood sample was withdrawn from the caudal vein. Half the fish (both males and females) received an intramuscular injection of saline (0.5 ml kg^{-1}). The other half received an injection of 0.5 ml kg^{-1} of Ovaprim (a synthetic analogue of gonadotropin releasing hormone plus a dopaminergic inhibitor, Syndel International Inc.). After injection, and after each

subsequent sampling time, each fish was placed in a fresh bag of water. The females were sampled at 0, 3, 6, 12, 18 and 24 h and the males at 0, 12, 18 and 24 h. Plasma samples were stored at -20°C until the assays were performed. Water samples were processed immediately.

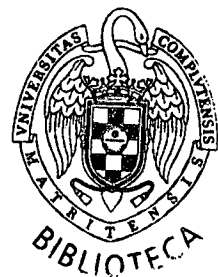
Steroid extraction and radioimmunoassay (RIA)

Free steroids were extracted from 100 μl of plasma by shaking with 4 ml of diethyl ether. Steroids were extracted from water samples by pumping them through Sep-pak Plus C_{18} cartridges (Waters Chromatography) as described by Scott and Sorensen (1994). Briefly, the steroids were eluted with 4 ml methanol, which was dried down at 45°C under a stream of nitrogen and then reconstituted in 200 μl water. Free steroids were extracted with diethyl ether. Deconjugation of sulfated steroids was carried out by acid solvolysis using a mixture of ethyl acetate and TFA, while glucuronidated steroids were deconjugated by enzymic hydrolysis with β -glucuronidase. Residues from the extractions were redissolved in 1 ml assay buffer (0.05 M sodium phosphate buffer, pH 7.6, containing 0.1% bovine serum albumin and 0.01% sodium azide).

Appropriate aliquots were taken in duplicate for radioimmunoassay (RIA). In all assays, the concentrations of the steroid standards ranged from 500 pg to 4 pg per tube. Plasma samples were assayed for E_2 , AD, T, 11-KT, $17,20\alpha\text{-P}$, $17,20\beta,21\text{-P}$, $17,20\beta\text{-P}$, and $17,21\text{-P}$ (17,21-dihydroxy-4-pregnene-3,20-dione). The details of the assays, including their specificity can be found in the papers by Scott et al. (1984), Scott and Sorensen (1994) and Moore et al. (2000).

Statistics

All data are presented as mean \pm S.E.M. Statistical analyses of plasma steroid concentrations and rate of release were carried out on logarithmically transformed data. Means of data from GnRHa or Ovaprim injected groups and control fish were compared using Student's *t* test.



RESULTS

Injection with GnRHa

After 24 h, all females yielded eggs after the application of gentle abdominal pressure; and, in the case of the males, 8 out of 11 yielded sperm. In order to determine which steroids, if any, were elevated in the plasma of GnRHa-injected females, pools were made of the free, sulphated and glucuronidated plasma extracts of the females which had been sampled at 18 h. Aliquots from these pools were then assayed for the nine different steroids. Quantification was made against two standards (100 and 10 pg tube⁻¹). On the basis of these results (data not shown), measurements were made in individual plasmas (from all sampling times) of: free 17 α -P, AD, T and 17,20 β -P; glucuronidated testosterone and 17,20 β -P; and sulphated 17,20 β -P. The pattern of secretion of all the steroids which were measured was similar (Figure 1). They all rose following the injection and reached their peak at either 12 h (C₁₉ steroids) or 18 h (C₂₁ steroids). AD and testosterone both started from a higher baseline than the other steroids.

The scan of steroids in male plasma (data not shown) revealed marked differences from the females – with the exception of AD, which was relatively abundant in both sexes. The pattern of secretion of at least five of these steroids with respect to time was also different from the females (Figure 2). AD concentrations showed little change over 24 h whilst 11-KT peaked at 6 h and C₂₁ steroids rose only slightly.

Injection with Ovaprim

Only 30% of the Ovaprim-injected females produced eggs at the end of sampling and none of the males released any sperm. The pattern of changes in plasma concentration of free 17,20 β -P, 17,20 α -P, and T and AD in the treated females (Figure 3) was very similar to the fish injected with GnRHa – although the absolute concentrations were lower. Steroid

concentrations in saline-injected fish did not change significantly.

A steroid scan of steroids in pooled water extracts from females sampled at 18 h (data not shown) revealed that some, but not all steroids, were two to three times higher in treated than in control fish. These steroids were then measured in individual extracts at all sampling times. Free 17,20 β -P was released in significantly higher amounts between 12 h and 24 h after the administration of Ovaprim (Figure 4). The conjugated forms of 17,20 β -P (Figure 4) and free 17,20 β ,21-P (Figure 5) were released at a significantly higher rate by the Ovaprim-treated fish at 24 h only. There were no significant differences between the amounts of AD released by females which received saline or Ovaprim at any time point (Figure 6). Free 17,20 α -P was released at a significantly higher rate in Ovaprim-treated fish between 12 h and 24 h after the injection (Figure 6).

Plasma concentrations of 11KT and AD showed a significant increase between 12 and 24 h post injection, and testosterone between 12 and 18 h, in Ovaprim-treated males (Figure 7). Plasma concentrations of 17,20 β -P decreased in the control group following saline injection whereas, in the Ovaprim group, they remained constant. The rate of release of 11-KT and AD into the water by male tench (Figure 8) was significantly higher in the Ovaprim-treated fish than those that received the saline injection. In the group that received the injection of Ovaprim, 17,20 β -P was released at a constant rate, whereas in the control group it underwent a significant decrease between 6 and 24 h after injection.

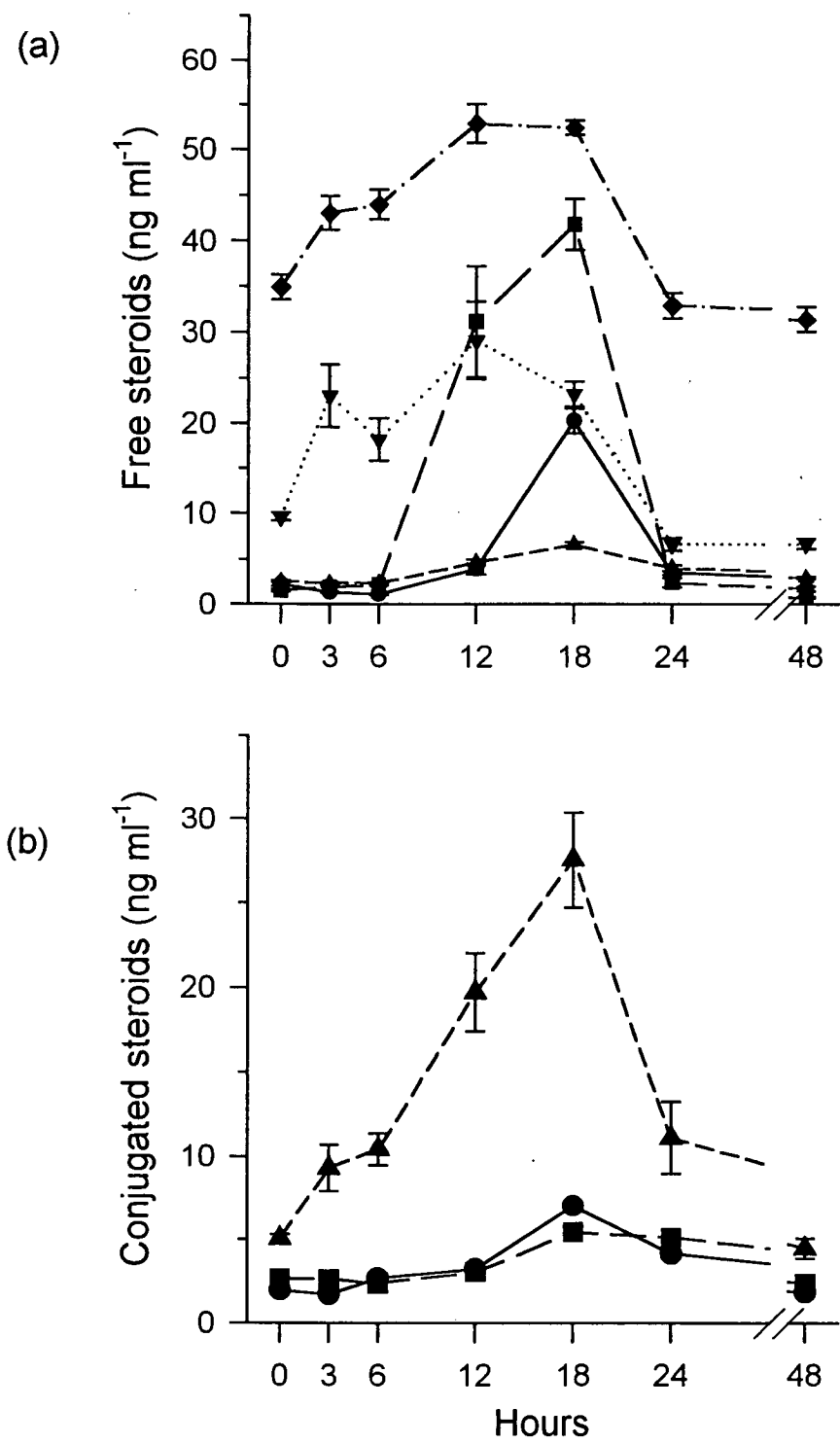


Figure 1. Plasma steroid concentrations (mean \pm S.E.M.) of (a) free 17,20 β -P (●), 17,20 α -P (■), 17,20 β ,21-P (▲), testosterone (▼) and AD (◆) and (b) sulphated 17,20 β -P (●), glucuronidated 17,20 β -P (■) and glucuronidated testosterone (▲) in female tench after injection of GnRH α .

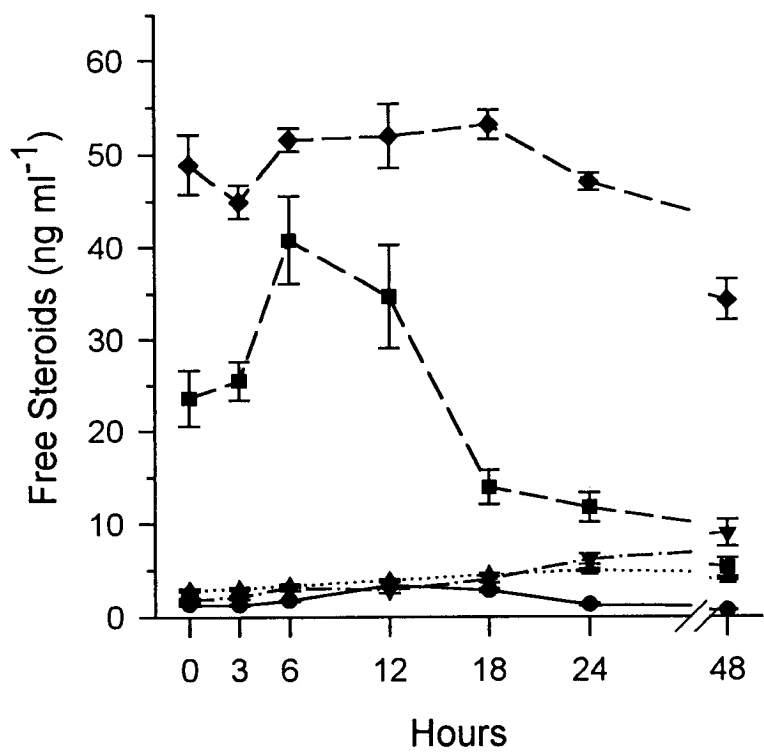


Figure 2. Plasma steroid concentrations (mean \pm S.E.M.) of free 17,20 α -P (●), 11-KT (■), 17,20 β ,21-P (▲), 17,21-P (▼) and AD (◆) in male tench after injection of GnRH α .

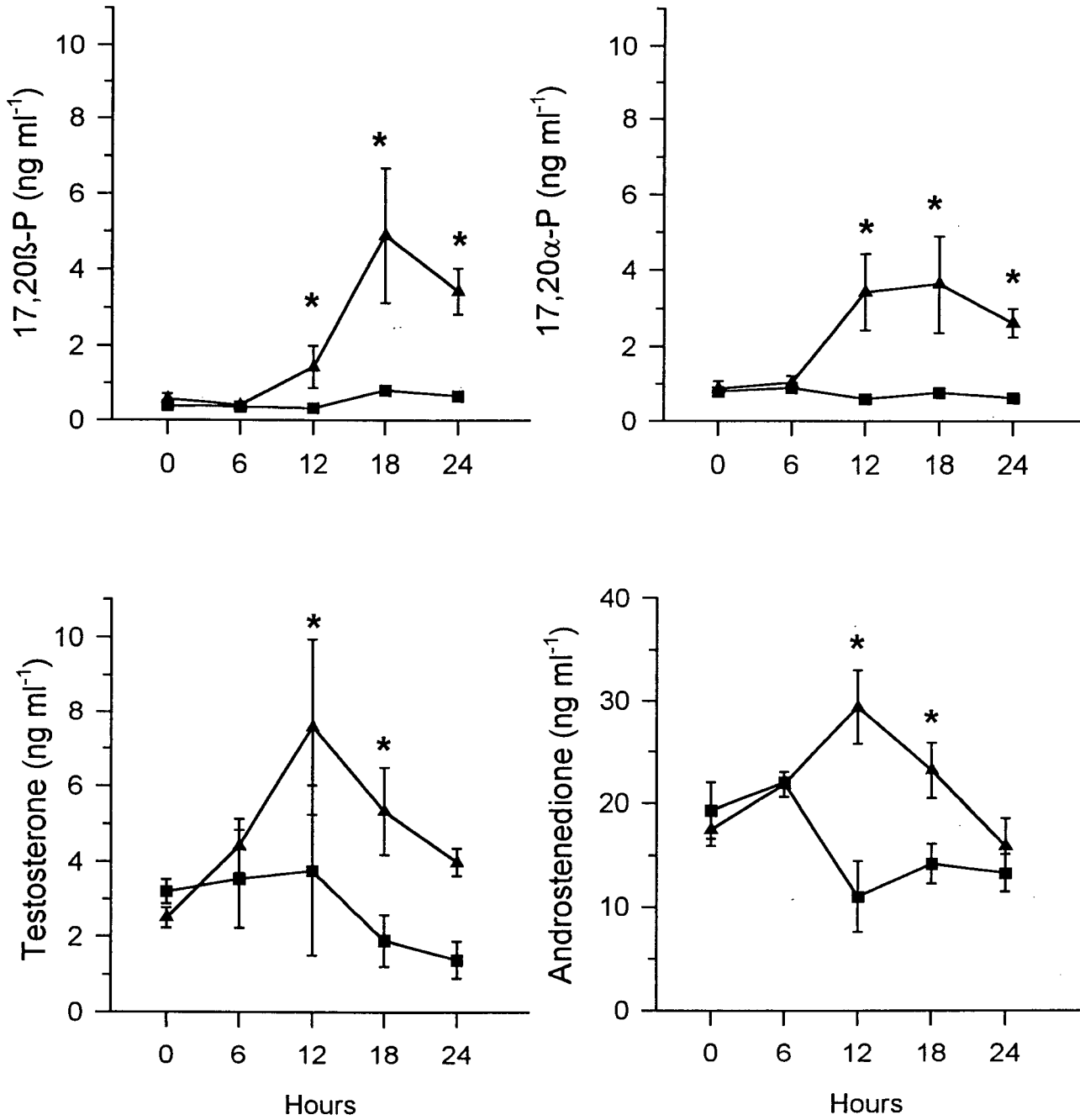


Figure 3. Plasma steroid concentrations (mean \pm S.E.M.) of free 17,20β-P, 17,20α-P, testosterone and AD in female tench after injection of saline (■) or Ovaprim (▲). Asterisks denote significant differences compared to the control ($P < 0.05$).

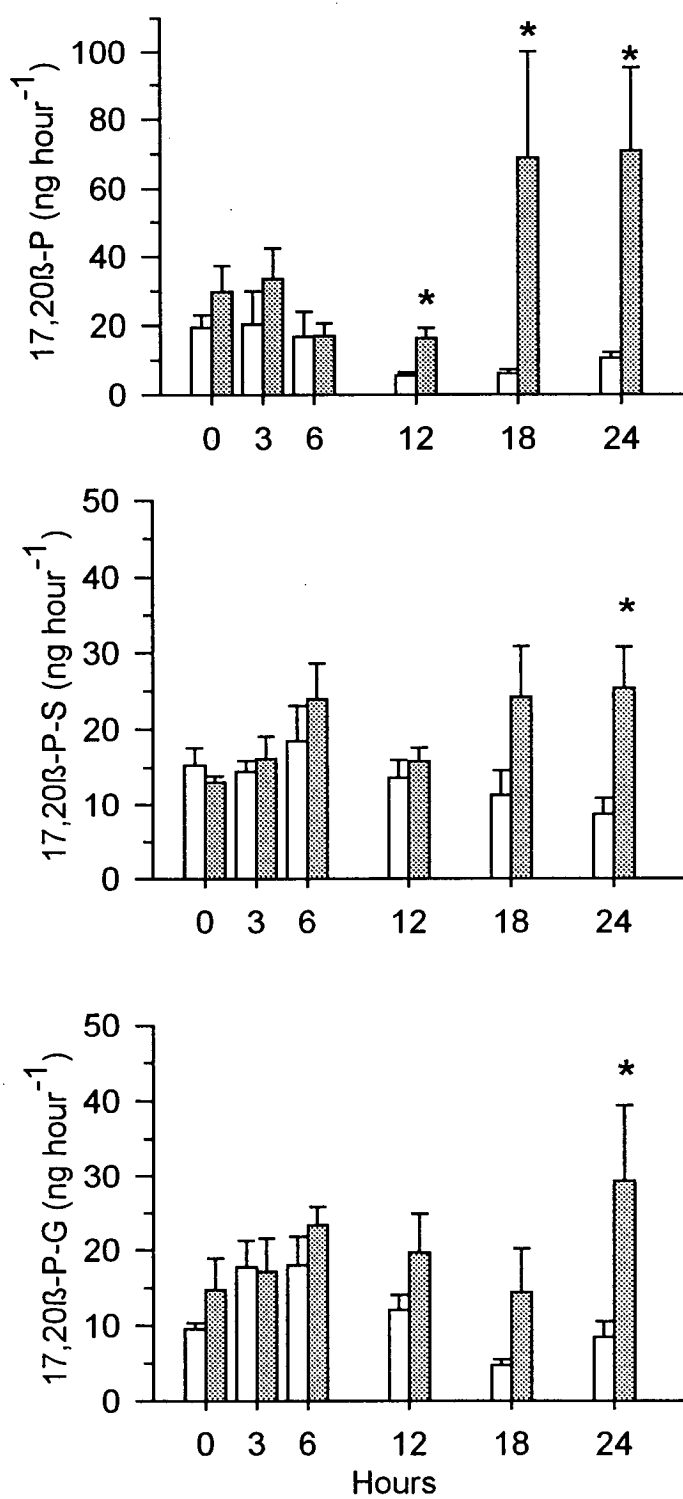


Figure 4. Rates of release (mean \pm S.E.M.) of free 17,20 β -P, sulphated 17,20 β -P and glucuronidated 17,20 β -P into the water by female tench at different times after treatment with saline (open bars) or Ovaprim (filled bars). Asterisks denote significant differences with respect to the control ($P < 0.05$).

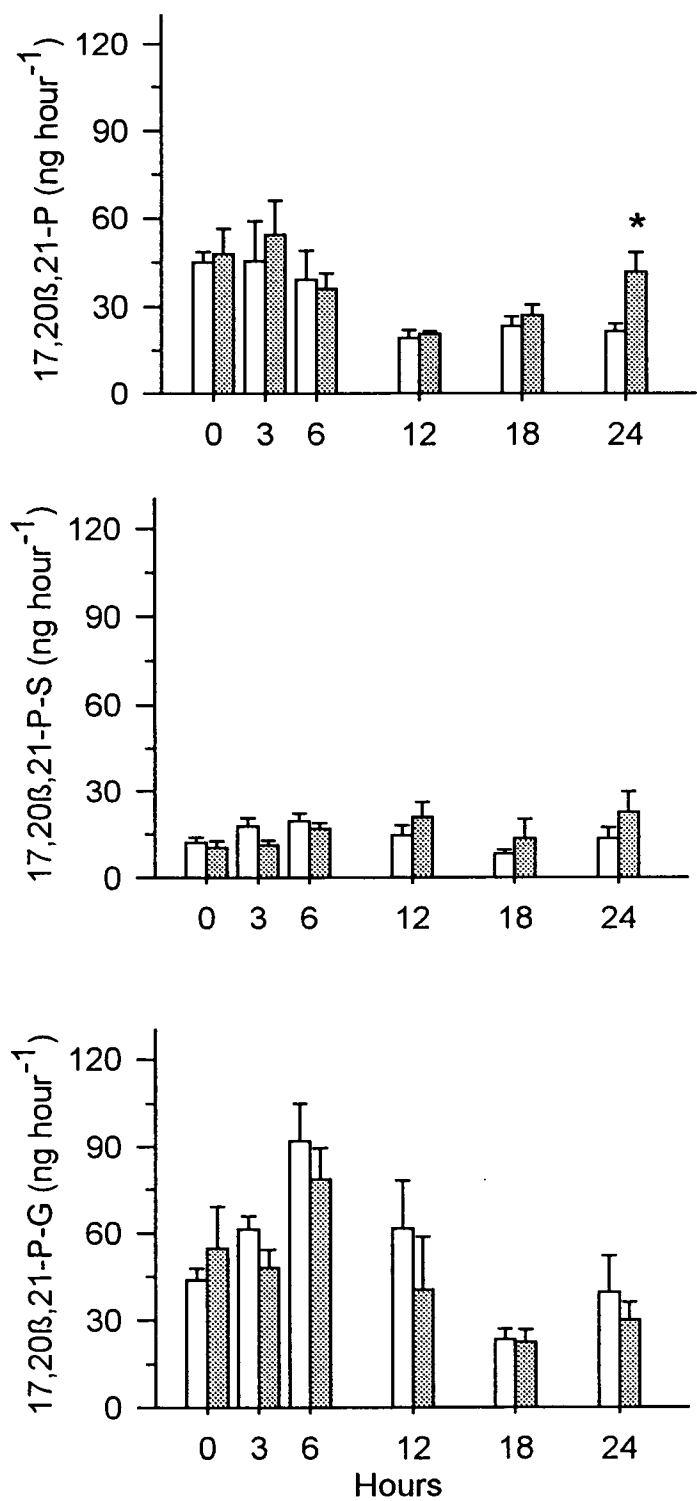


Figure 5. Amounts (mean \pm S.E.M.) of free 17,20 β ,21-P, sulphated 17,20 β ,21-P and glucuronidated 17,20 β ,21-P release to the water by female tench after injection of saline (open bars) or Ovaprim (filled bars). Asterisks denote significant differences compared to the control ($P < 0.05$).

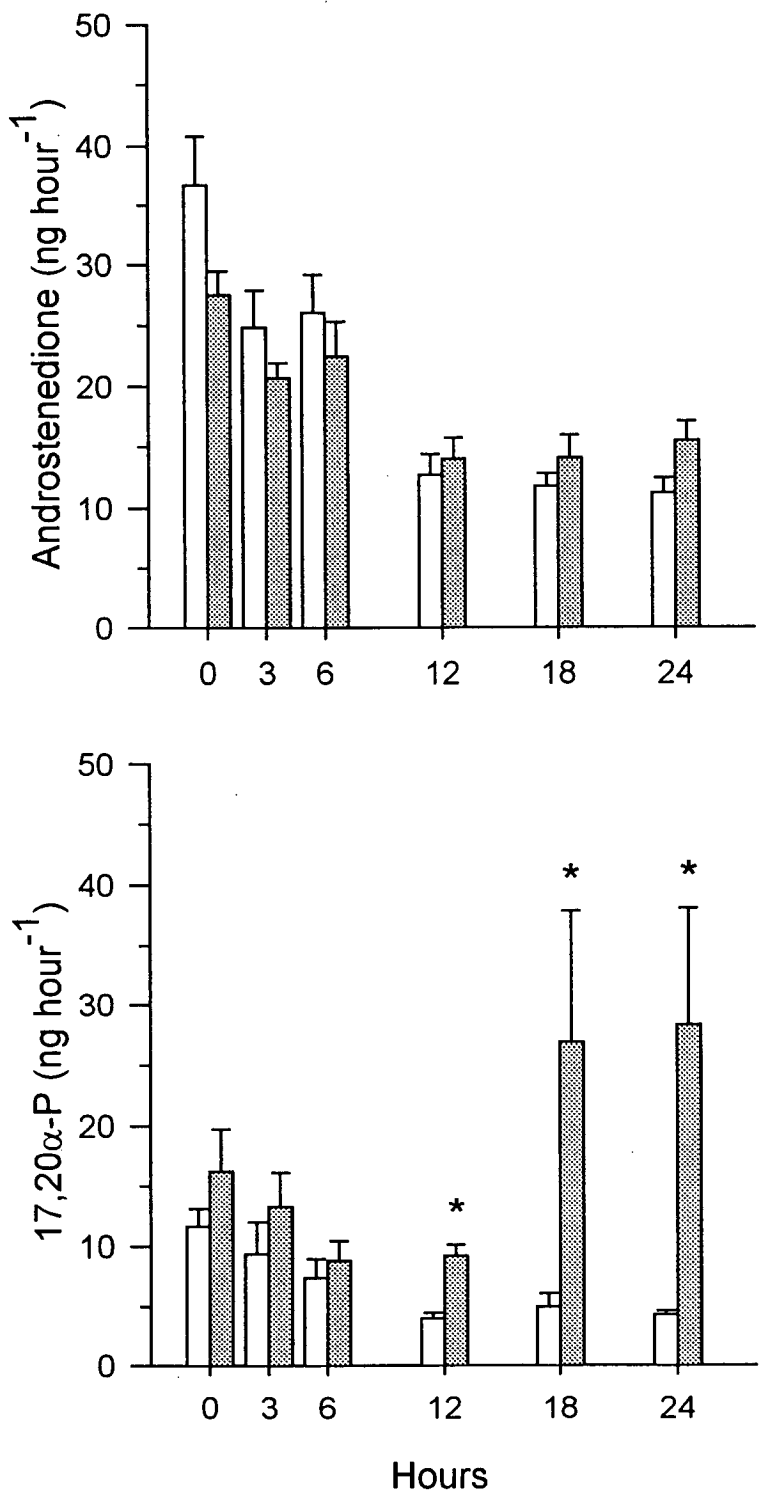


Figure 6. Rates of release of AD and free 17,20α-P into the water from female tench after treatment with saline (open bars) or Ovaprim (filled bars). Asterisks denote significant differences compared to the control ($P<0.05$).

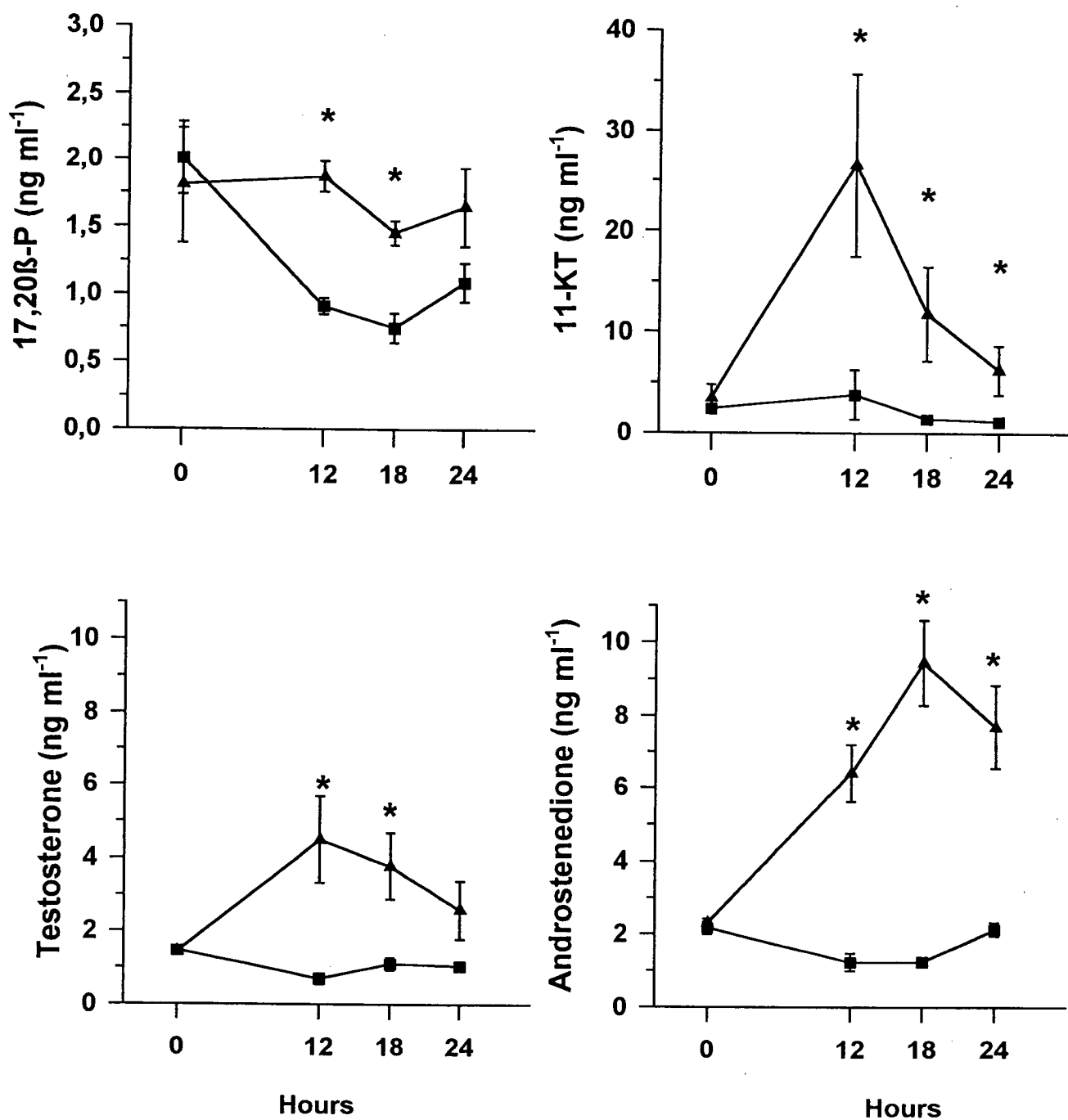


Figure 7. Plasma steroid concentrations (mean \pm S.E.M.) of free 17,20 β -P, 11-KT, testosterone and AD in male tench after injection of saline (■) or Ovaprim (▲). Asterisks denote significant differences compared to the control ($P < 0.05$).

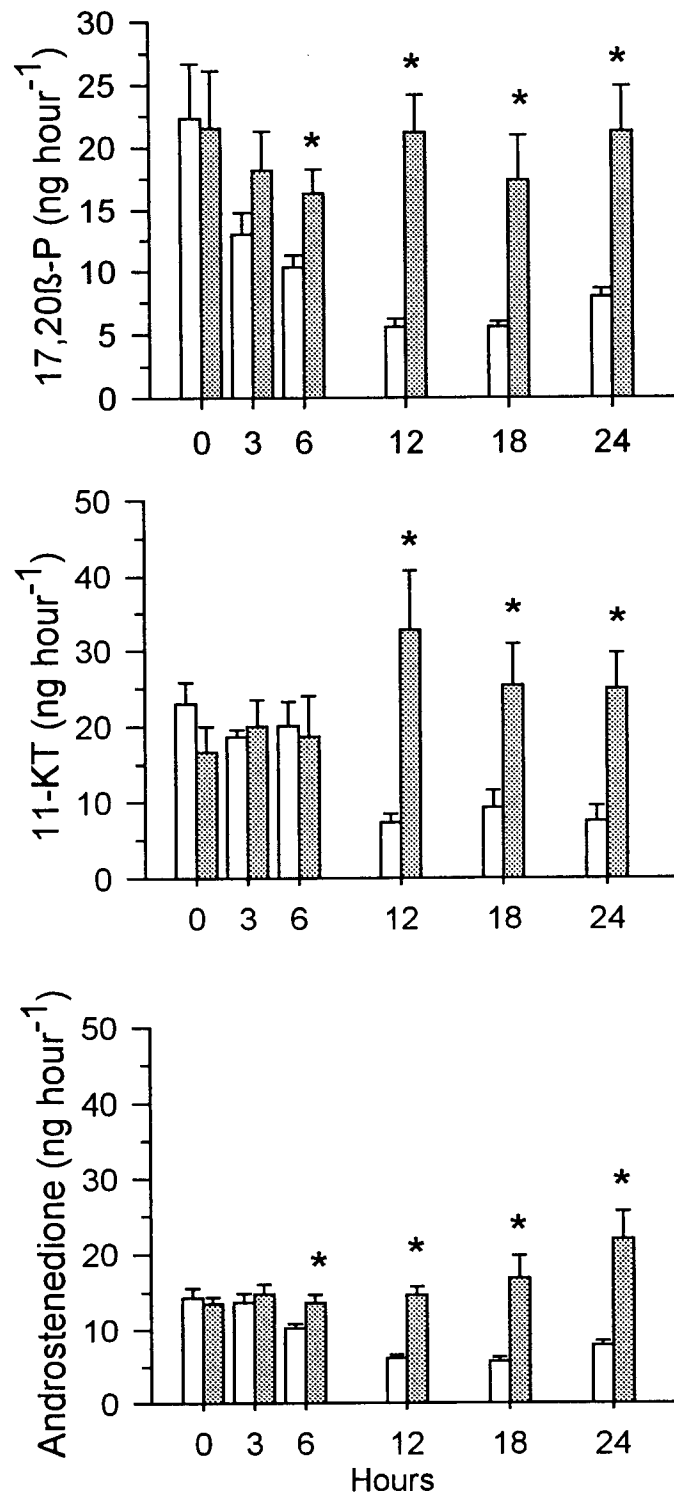


Figure 8. Amounts (mean \pm S.E.M.) of free 17,20 β ,21-P, 11-KT and AD release into the water by male tench after injection of saline (open bars) or Ovaprim (filled bars). Asterisks denote significant differences compared to the control ($P < 0.05$).

DISCUSSION

This study shows that after treatment with GnRHa or Ovaprim, there was an increase in plasma concentrations of sex steroids in both male and female tench. The rate of release of some of these sex steroids into the water was also significantly higher in treated than untreated fish.

In the females which were injected with either GnRHa or Ovaprim, it was observed that plasma concentrations of free 17,20 α -P, free 17,20 β ,21-P, free and conjugated 17,20 β -P, free and glucuronidated testosterone and AD, all increased following the injection. Many studies have reported that at the time of oocyte maturation and ovulation there is a shift from the production of mainly C₁₉ and C₁₈ steroids to C₂₁ steroids (Nagahama et al. 1986). This change is associated with a decrease in aromatase activity in postvitellogenic follicles (Sakai et al 1988) and changes higher up the biosynthetic pathway which ensure that 17-P is converted into other C₂₁ steroids rather than into C₁₉ steroids in response to GtH stimulation (Scott et al. 1983). Evidence of this 'shift' was found in the females in the present study. The androgens (apart from AD in males) increased almost immediately in response to the GnRHa injections and reached their peak at about 12 h, while the C₂₁ steroids did not start to rise until after 6 h and reached their peak at 18 h. The glucuronide of testosterone, the only conjugated steroid which rose more than five-fold, peaked at 18 h.

It is well established that final oocyte maturation in teleosts is induced by C₂₁ steroids (Scott and Canario 1987). In a seasonal study of male and female tench, it was established that plasma of both sexes contained both variants of the maturation-inducing steroid (MIS), 17,20 β -P and 17,20 β ,21-P (Pinillos et al. 2003a). After induction of spawning, both C₂₁ steroids were also found in plasma of both sexes. 17,20 β -P was first identified in the plasma of female Pacific and Atlantic salmon (Idler et al. 1960). Different studies have revealed the involvement of this hormone in the maturation of the oocyte in

several species (Jalabert 1976; Goetz 1983; Yamauchi et al. 1984; Canario and Scott 1988). Moreover, a role in sperm maturation in some teleosts has also been indicated (Nagahama 1994). In tench, it has already been observed that, *in vitro*, 17,20 β -P accelerates the maturation of oocytes, and that artificial spawning is stimulated (40 to 60% of the females treated with this steroid underwent complete spawning; Epler et al. 1993). 17,20 β 21-P is known to be equipotent to 17,20 β -P in oocyte maturation bioassays in plaice *Pleuronectes platessa* (Canario and Scott 1990), rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Canario and Scott 1988) and Atlantic croaker (Trant and Thomas 1989) *in vitro*. In the plasma of GnRHa injected female tench, both C₂₁ steroids peak at 18 h after injection, the increase being greater for 17,20 β -P than 17,20 β 21-P. More studies are necessary to elucidate which C₂₁ steroid (if not both) is the MIH in tench.

A striking observation in the first trial was the high starting concentrations of AD in the plasma of both sexes. This was confirmed by re-extraction and re-assay of the plasmas. The GnRHa injection caused a further increase in the females, but little or no change in the males. However, high starting concentrations of AD were not found in the second trial. This steroid did still increase however in response to the GnRHa injection.

In the Ovaprim-injected females, 17,20 α -P, 17,20 β -P and T were all elevated in plasma at 18 h. However, the concentrations were lower than in the GnRHa-injected fish. The same situation was found in the males. Ovaprim contains, in addition to GnRHa, a dopaminergic inhibitor, which in goldfish causes an enhanced release of gonadotropin (Chang and Peter 1983). The probable reason why the Ovaprim-injected fish did not have higher steroid concentrations than the GnRHa-injected fish is that they were less advanced in their stage of sexual maturity. They were also much smaller. One other possibility is that dopamine does not serve to inhibit the release of GtH in tench. Kouril (1998) reported that a greater efficiency in spawning induction, and a higher relative egg weight, occurred

in female tench treated with GnRHa than in fish injected with Ovaprim.

The assay of the water extracts from female tench established that free 17,20 β -P was released at a higher rate in Ovaprim- than in saline-injected fish. This is similar to female goldfish treated with human chorionic gonadotropin (HCG) (Scott and Sorensen 1994). The absolute amount of steroid released by female goldfish at peak rate of release was very similar to that in tench. As in goldfish, there also appears to be a close correspondence between the concentration of free 17,20 β -P in the plasma and the rate of release into the water. In goldfish, 17,20 β -P acts as a primer pheromone; the female releases it into the water, where it is detected by the males and brings about an increase in plasma gonadotropin concentrations and sperm production (Stacey et al. 1989). Both 17,20 β -P conjugates are also released by female tench after Ovaprim treatment, although at lower rate than the free form. In HCG-treated female goldfish, the amounts of conjugated 17,20 β -P which are released are actually higher than those of the free form (Scott and Sorensen 1994). Although it has yet to be established whether free or glucuronidated 17,20 β -P have a pheromonal role in tench, it has been established that male tench are able to smell both these steroids (Pinillos et al. 2003b - *accompanying paper*).

Only the free form of 17,20 β ,21-P was released into the water at a significantly higher rate in Ovaprim-injected females and then only at 24 h. In contrast, Scott and Sorensen (1994) found that more 17,20 β ,21-P than 17,20 β -P was released into the water by HCG-injected female goldfish.

Although the plasma concentrations of testosterone and 17,20 β -P in Ovaprim-treated female tench were very similar after 18 h, the amount of 17,20 β -P released into the water at this time was six-fold higher than that of testosterone. There was similar disparity in goldfish (Scott and Sorensen 1994) and it was suggested that this could be due to the fact that testosterone is retained in the plasma by sex steroid binding proteins (SSBP) to a

greater degree than 17,20 β -P. Several studies have reported that SSBPs have a higher binding affinity for testosterone than for 17,20 β -P in teleosts (Chang and Lee 1992; Laidley and Thomas 1994; Hobby et al. 2000).

Another steroid present in holding water of GnRH-injected female tench was 17,20 α -P. This steroid has been found in other cyprinid species, although its biological role remains unknown (Scott and Sorensen 1994; Ebrahimi et al. 1996). It has been proposed by Scott and Sorensen (1994) that the presence of 17,20 α -P is due to the non-specific action of aldose dehydrogenases which, in mammals, have been shown to be able to convert 17-P to 17,20 α -P (Warren et al 1993).

As in male goldfish, male tench release AD into the water. Poling et al. (2001) showed that AD serves to inhibit courtship behaviour in goldfish. They concluded that it probably maintains low levels of gonadotropin and milt in males - conserving resources for spawning events. However, a similar role in tench is doubtful, as the olfactory epithelium of males is insensitive to this steroid (Pinillos et al. 2003b - *accompanying paper*).

In conclusion, plasma concentrations of a variety of sex steroids in male and female tench are enhanced by injection of GnRH α . Furthermore, some of these steroids – including 17,20 β -P, which is a potent odorant in male tench – are also released into the water.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by a grant from the Spanish Ministry of Culture to M.L. Pinillos. The authors are very grateful to the fish farm “Vegas del Guadiana” for providing the fish and for allowing us to carry out our studies at their installations.

REFERENCES

- Becker, D., Galili, N. and Degani, G. 1992. GCMS-identified steroids and steroid glucuronides in gonads and holding water of *Trichogaster trichopterus* (Anabantidae, Pallas 1770). *Comp. Biochem. Physiol. B* 103: 15-19.
- Billard, R., Fostier, A., Weil, C. and Breton, B. 1982. Endocrine control of spermatogenesis in teleost fish. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 39: 65-79.
- Canario, A.V.M. and Scott, A.P. 1988. Structure-activity relationships of C21 steroids in an in vitro oocyte maturation bioassay in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 71: 338-348.
- Canario, A.V.M. and Scott, A.P. 1990. Plasma levels of ovarian steroids, including 17 α -20 α -dihydroxy-4-pregnen-3-one and 3 β ,17 α ,20 α -trihydroxy-5 β -pregnane, in female dabs (*Limanda limanda*) - marine flatfish - induced to mature and ovulate with human chorionic gonadotropin. *Gen. Comp. Endocrinol.* 77: 177-191.
- Chang, C -F. and Lee Y-H 1992. Purification of the sex-binding protein from common carp (*Cyprinus carpio*) plasma. *Comp. Biochem. Physiol. B* 101: 587-590.
- Chang, J.P. and Peter, R.E. 1983. Effects of dopamine on gonadotropin release in female goldfish, *Carassius auratus*. *Neuroendocrinology* 36: 351-357.
- Crim, L.W., Peter, R.E. and Billard, R. 1981. Onset of gonadotropic hormone accumulation in the immature trout pituitary gland in response to estrogen or aromatizable steroid hormones. *Gen. Comp. Endocrinol.* 44: 374-381.
- Dulka, J.G., Stacey, N.E., Sorensen, P.W. and Van Der Kraak, G.J. 1987. A steroid sex pheromone synchronizes male-female spawning readiness in goldfish. *Nature (London)* 325: 251-253.
- Ebrahimi, M., Scott, A.P. and Kime, D.E. 1996. Extragonadal production of 17,20-dihydroxy-4-pregnen-3-ones in vitro in cyprinid fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 104:

296-303.

- Epler, P. Mejza, T. Bieniarz, K. and Sokolowska-Mikolajczyk, M. 1993. The effect of 17α hydroxy 20β dihydroprogesterone (17α 20β P) on carp and tench oocyte maturation *in vitro* and *in vivo*. Pol. Arch. Hydrobiol. 40: 197-207.
- Goetz, F.W. 1983. Hormonal control of oocyte final maturation and ovulation in fishes. In: Fish Physiology. Vol. IXA, pp. 117-170. Edited by W.S. Hoar, D.J. Randall and E.M. Donaldson. Academic Press, New York.
- Greenwood, L. N., Scott, A. P., Vermeirssen, E. L. M., Fostier, A., Mylonas, C. and Pavlidis, M. 2001. Plasma steroids in mature common dentex (*Dentex dentex*) stimulated with a gonadotropin-releasing hormone agonist. Gen. Comp. Endocrinol. 123: 1-12.
- Hobby, A.C. Pankhurst, N.W. and Geraghty, D.P. 2000. A comparison of sex steroid binding protein (SBP) in four species of teleost fish. Fish Physiol. Biochem. 23: 245-256.
- Idler, D.R., Fagerlund, U.H.M and Ronald, A.P. 1960. Isolation of pregnen-4-one $17,20$ -diol-3-one from the plasma of Pacific salmon. Biochem. Biophysic. Res.Com. 2: 133-137.
- Jalabert, B. 1976. In vitro oocyte maturation and ovulation in rainbow trout (*Salmo gairdneri*), northern pike (*Esox lucius*) and goldfish (*Carassius auratus*). J. Fish. Res. Board Can. 33: 974-988.
- Kobayashi, M., Aida, K. and Hanyu, I. 1989. Induction of gonadotropin surge by steroid hormone implantation in ovariectomized and sexually regressed female goldfish. Gen. Comp. Endocrinol. 73: 469-476.
- Kouril, J. 1998. Hormonally induced spawning of tench *Tinca tinca* (L.) females. (A review). Pol. Arch. Hydrobiol. 45: 415-433.

- Laidley, C.W. and Thomas, P. 1994. Partial characterization of a sex-steroid binding protein in the spotted seatrout (*Cynoscion nebulosus*). Biol. Reprod. 51: 982-992.
- Maren, T.H., Embry, R. and Broder, L.E. 1968. The excretion of drugs across the gills of the dogfish, *Squalus acanthias*. Comp. Biochem. Physiol. 26: 853-864.
- Moore, A. and Scott, A.P. 1991. Testosterone is a potent odorant in precocious male Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr. Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B 332:241-245
- Moore, R.K., Scott, A.P. and Collins, P.M. 2000. Circulating C-21 steroids in relation to reproductive condition of a viviparous marine teleost, *Sebastes rastrelliger* (Grass Rockfish). Gen. Comp. Endocrinol. 117: 268-280.
- Nagahama, Y. 1994. Endocrine regulation of gametogenesis in fish. Int. J. Dev. Biol. 38: 217-229.
- Nagahama, Y., Goetz, F.W. and Tan, J.D. 1986. Shift in steroidogenesis in the ovarian follicles of the goldfish (*Carassius auratus*) during gonadotropin-induced oocyte maturation. Dev. Growth Differ. 28: 555-561.
- Pasmanik, M. and Callard, G. 1986. Characteristics of a testosterone–estradiol binding globulin (TEBG) in goldfish serum. Biol. Reprod. 35: 838-845.
- Pérez-Regadera, J.J. 1997. Considerations on fish farming and tench. Proceedings of the II International Workshop on Biology and culture of the tench, Badajoz, Spain, pp 1-3.
- Peter, R.E., Chang, J.P., Nahorniak, C.S., Omeljaniuk, R.J., Sokolowska, M., Shih, S.H. and Billard, R. 1986. Interactions of catecholamines and GnRH in regulation of gonadotropin secretion in teleost fish. Recent Prog. Horm. Res. 42: 513-548.
- Pinillos, M.L., Delgado, M.J. and Scott, A.P. 2003a. Seasonal changes in plasma sex steroid concentration and gonadal morphology of tench, *Tinca tinca*. Aquac. Res.

In press.

- Pinillos, M.L., Hubbard, P.C., Canário, A.V.M. and Scott, A.P. 2003b. Olfactory sensitivity to C-21 steroids and prostaglandins in the freshwater cyprinid, *Tinca tinca*. Fish Physiol. Biochem. (submitted - *accompanying paper*)
- Poling, K.R., Fraser, E.J. and Sorensen, P.W. 2001. The three steroidal components of the goldfish preovulatory pheromone signal evoke different behaviours in males. Comp. Biochem. Physiol. B 129: 645-651.
- Sakai, N., Iwamatsu, T., Yamauchi, K., Suzuki, N. and Nagahama, Y. 1988. Influence of follicular development on steroid production in the medaka (*Oryzias latipes*) ovarian follicle in response to exogenous substrates. Gen. Comp. Endocrinol. 71: 516-523.
- Scott, A.P. and Canario A.V.M. 1987. Status of oocyte maturation-inducing steroids in teleost. In: Proc. 3rd Int. Symp. Reproductive Physiology of Fish. pp 224-234. Edited by D.R. Idler, L.W. Crim and J.M. Walsh. Memorial University of Newfoundland, St John's.
- Scott, A.P. and Sorensen, P.W. 1994. Time course of release of pheromonally active gonadal steroids and their conjugates by ovulatory goldfish. Gen. Comp. Endocrinol. 96: 309-323.
- Scott, A.P. and Vermeirssen, E.L.M. 1994. Production of conjugated steroids by teleost gonads and their role as pheromones. In: Perspectives in Comparative Endocrinology. pp. 645-654. Edited by K. G. Davey, R.E. Peter and S.S. Tobe. National Research Council of Canada, Ottawa.
- Scott, A.P., Sumpter, J.P. and Hardiman, P.A. 1983. Hormone changes during ovulation in the rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). Gen. Comp. Endocrinol. 49: 128-134.

- Scott, A.P., MacKenzie, D.S. and Stacey, N.E. 1984. Endocrine changes during natural spawning in the white sucker, *Catostomus commersonii* II. Steroid hormones. Gen. Comp. Endocrinol. 56: 349-359.
- Smith, R.L. 1973 The Excretory Function of Bile. Chapman and Hall, London.
- Sorensen, P. W., Scott, A. P. and Kihslinger, R. L. 2000. How common hormonal metabolites function as relatively specific pheromonal signals in the goldfish. In Proceedings of the 6th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, Bergen, Norway, July 4-9, 1999 (Norberg, B., Kjesbu, O. S., Taranger, G. L., Andersson, E. and Stefansson, S. O., Editors), pp. 125-128. Bergen 2000, Norway.
- Sorensen, P.W., Scott, A.P., Stacey, N.E. and Bowdin, L. 1995. Sulfated 17,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one functions as a potent and specific olfactory stimulant with pheromonal actions in the goldfish. Gen. Comp. Endocrinol. 100: 128-142.
- Stacey, N.E. and Sorensen, P.W. 1986. 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one: A steroidal primer pheromone increasing milt volume in the goldfish, *Carassius auratus*. Canad. J. Zool. 64: 2412-2417.
- Stacey, N.E. and Cardwell, J.R. 1995. Hormones as sex pheromones in fish. Widespread distribution among freshwater species. In: Proc. 5th Int. Symp. Reproductive Physiology of Fish. pp 244-248. Austin, Texas.
- Stacey, N. E. and Cardwell, J. R. 1997. Hormonally-derived sex pheromone systems in fish: new approaches to controlled reproduction. In: Recent Advances in Marine Biotechnology, pp. 407-454. Edited by Fingerman M., Nagabhushanam R. and Thompson M. F. Oxford-IBH, New Delhi.
- Stacey, N.E., Sorensen, P.W., Van Der Kraak, G.J. and Dulka, J.G. 1989. Direct evidence that 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one functions as a goldfish primer

- pheromone: Preovulatory release is closely associated with male endocrine responses. *Gen. Comp. Endocrinol.* 75:62-70
- Stacey, N.E., Sorensen, P.W., Dulka, J.G. Cardwell, J.R. and Irvine, A.S. 1991. Fish sex pheromones: Current status and potential applications. *Bull. Inst. Zool. Academia Sinica, Monogr.* 16: 189-227.
- Trant, J.M. and Thomas, P. 1989. Isolation of a novel maturation-inducing steroid produced in vitro by ovaries of Atlantic croaker. *Gen. Comp. Endocrinol.* 75: 397-404.
- Van Den Hurk, R., Schoonen, W.G.E.J., Van Zoelen, G.A. and Lambert, J.G.D. 1987. The biosynthesis of steroid glucuronides in the testes of the zebrafish, *Brachydanio rerio*, and their pheromonal function as ovulation inducers. *Gen. Comp. Endocrinol.* 68: 179-188.
- Van Weerd, J.H., Sukkel, M., Lambert, J.G.D. and Richter, C.J.J. 1991. GCMS-identified steroids and steroid glucuronides in ovarian growth stimulating holding water from adult African catfish, *Clarias gariepinus*. *Comp. Biochem. Physiol. B* 98: 303-311.
- Vermeirssen, E.L.M. and Scott, A.P. 1996. Excretion of free and conjugated steroids in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Evidence for branchial excretion of the maturation-inducing steroid, 17,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one. *Gen. Comp. Endocrinol.* 101: 180-194.
- Wallace, R.A. 1985. Vitellogenesis and oocyte growth in nonmammalian vertebrates. In: *Developmental Biology*. pp. 127-177. Edited by L.W. Browder. Plenum Press, New York.
- Warren, J.C., Murdock G.L., Ma, Y., Goodman, S.R. and Zimmer, W.E. 1993. Molecular cloning of testicular 20 α -Hydroxysteroid Dehydrogenase: Identity with aldose reductase. *Biochemistry* 32: 1401-1406.

- Yamauchi, K., Kagawa, H., Ban, M., Kasahara N. and Nagahama, Y. 1984. Changes in plasma estradiol-17 β and 17 α ,20 β -dihidroxy-4-pregnen-3-one levels during final oocyte maturation of the masu salmon, *Oncorhynchus rhodurus*. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 50: 2137.
- Yoshikuni, M. and Nagahama, Y. 1991. Endocrine regulation of gametogenesis in fish. Bull. Inst. Zool. Academia Sinica 16: 139-172.

5.3. Artículo 5

**OLFACTORY SENSITIVITY TO C₂₁ STEROIDS AND PROSTAGLANDINS IN
THE FRESHWATER CYPRINID, *TINCA TINCA***

M.L. Pinillos¹, P.C. Hubbard², A.V.M Canario² and A.P. Scott¹

¹The Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science, The Nothe, Barrack Road, Weymouth, Dorset DT4 8UB, U.K. and ²Centro de Ciências do Mar, Universidade do Algarve, Campus de Gambelas, 8000-810 Faro, Portugal.

Author for Correspondence:

Peter Hubbard: (Fax.: +351-289-818353, Tel.: +351-289-817761, Ext. 7880, E-mail.: phubbard@ualg.pt)

Running Title: Olfaction of Putative Sex Pheromones in Tench

Key Words: Electro-olfactogram, PGF_{2α}, 17,20β-P, 17,20β-P-Glu, 17,20β-P-SO₄, pheromone, reproduction, teleost, tench.

ENVIADA A: FISH PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY

ABSTRACT

The present study assessed whether tench (*Tinca tinca*) are able to give an electro-olfactographic (EOG) response to a variety of steroids and prostaglandins which have previously been shown to have important pheromonal roles in the goldfish (and, in the case of the steroids, are known to be released into the water by male and female tench). Male tench had high olfactory sensitivity to the C₂₁ steroid, 17,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (17,20 β -P) - giving large (up to 8 mV at 10⁻⁶ M) responses and a predicted threshold of detection of 10⁻¹² M; very similar to the goldfish. In contrast to the goldfish, however, male tench were highly sensitive to glucuronidated 17,20 β -P (threshold of detection of 10^{-11.5} M) and considerably less sensitive to sulphated 17,20 β -P (threshold of detection of 10^{-9.5} M). Furthermore, preliminary data from cross-adaptation studies (using 10⁻⁹ M 17,20 β -P) suggest that both the free and conjugated forms are detected by the same olfactory receptor(s). Male tench were also sensitive to the C₂₁ steroid, 17,20 β ,21-trihydroxy-4-pregnen-3-one (threshold of detection; 10⁻¹⁰ M), but largely insensitive to a range of C₁₈ steroids (testosterone, androstenedione, and 11-ketotestosterone). Male tench were also highly sensitive to prostaglandin F_{2 α} (PGF_{2 α}) and 15-keto PGF_{2 α} , giving large amplitude EOG responses (up to 9 and 8 mV, respectively, at 10⁻⁶ M), and thresholds of detection of 10^{-11.5} and 10⁻¹¹ M, again similar to the goldfish. Our data show that tench, in general, have high olfactory sensitivity to pheromones important in goldfish reproduction. Nevertheless, species-specificity may be conveyed by differences in sensitivity to conjugates or to other as yet unidentified steroids. However, this, plus the pheromonal role(s) of free and conjugated 17,20 β -P in tench, remains to be established.

ABREVIATIONS

EOG; electro-olfactogram, $\text{PGF}_{2\alpha}$; prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$, 17,20 β -P; 4-pregnene-17 α ,20 β -diol-3-one, 17,20 β -P-Glu; 17,20 β -P; 4-pregnene-17 α ,20 β -diol-3-one glucosiduronate, 17,20 β -P- SO_4 ; 4-pregnene-17 α ,20 β -diol-3-one sulphate

INTRODUCTION

Pheromones are thought to play a pivotal role in fish reproduction (Stacey and Cardwell 1997). However, much of the evidence to date comes from only a few species. One of the best-studied is the goldfish, *Carassius auratus* L., one of the few teleosts in which the chemical identities (Dulka et al. 1987; Sorensen et al. 1988; Stacey et al. 1989; Sorensen et al. 1995), biological roles (Stacey and Sorensen 1986; Poling et al. 2001), routes of release (Scott and Sorensen 1994; Appelt and Sorensen 1999) and means of detection (Sorensen et al. 1987; Sorensen et al. 1995; Kitamura et al. 1994; Bjerselius and Olsén 1993; Sorensen et al. 1988; Sorensen and Goetz 1993) have been well described. With such a large amount known about goldfish pheromones, it is extremely interesting to establish if, and how, species-specificity might be conferred on a pheromonal message when populations of related species live in the same environment, and follow similar reproductive strategies, as is the case with many cyprinids. The tench *Tinca tinca* L. is a freshwater cyprinid of still waters and slow-flowing rivers of Europe and mid-Asia (e.g. Wheeler 1978), often inhabiting the same environments as the goldfish, or at least its immediate ancestor, the crucian carp (*Carassius carassius* L.), and close relative, the common carp (*Cyprinus carpio* L.). Thus, the present study was carried out to assess the olfactory sensitivity of the tench to the reproductive pheromones so far identified in the goldfish, several of which have also been found circulating in the plasma of female tench and are released into the water (Pinillos et al. 2003 - *accompanying paper*). Thus, we may begin to understand how each species might recognise the message from conspecifics amongst the rich pheromonal "soup" that such enclosed still-water environments might develop.

The tench

The tench is a cultured fish of increasing economic value, often co-farmed with its relative the common carp (Steffens 1995), and commonly eaten in Germany and eastern Europe. It is a multi-spawning species, spawning several times during the season (May to July), although this is highly temperature dependent (Breton et al. 1980a and 1980b). As temperatures decrease, it comes increasingly inactive, and during the winter months ceases to feed at all and becomes effectively torpid. It is, nevertheless, a very hardy fish, extremely tolerant of low oxygen tensions, often thriving in small, overgrown ponds that few other species could tolerate (Muus and Dahlstrom 1971).

C₂₁ steroids as pheromones

The olfactory system of the goldfish is highly sensitive to 17,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (17,20 β -P) and its sulphate (17,20 β -P-SO₄; Sorensen et al. 1987; Sorensen et al. 1995; Kitamura et al. 1994; Bjerselius and Olsén 1993). The 17,20 β -P has a well defined "primer" role in this species (Stacey et al. 1989) whereby it is released to the water by ovulatory females and detected by the males, within which it causes a release of pituitary gonadotrophin (Dulka et al. 1987) and an increase in milt production and sperm motility (Defraipont and Sorensen 1993). The 17,20 β -P-SO₄ has a similar pheromonal role to the free form (Poling et al. 2001), but it is detected by a distinct olfactory receptor mechanism (Sorensen et al. 1995). Androstenedione is also released to the water by preovulatory female goldfish (Scott and Sorensen 1994), and by other males (Sorensen and Scott 1994), where it inhibits the responsiveness of males to 17,20 β -P (Stacey et al. 1991).

Prostaglandins as pheromones

PGF_{2α} and its metabolite, 15-keto PGF_{2α}, have a "releaser" role, being emitted by ovulatory female goldfish in order to stimulate sexual behaviour in the male (Sorensen et al. 1988; Sorensen and Goetz 1993). The olfactory system of many other species of fish from a wide range of taxonomic groups have also been shown to be highly sensitive to prostaglandins, particularly PGF_{2α} and 15-keto PGF_{2α} (Stacey et al. 1996).

Other steroids released by the goldfish (data from Scott and Sorensen 1994; Sorensen and Scott 1994)

17,20β-P-Glu 17,20β-dihydroxy-4-pregnen-3-one 20-glucosiduronate; the glucuronidated form of 17,20β-P; released by female goldfish, but 100-fold weaker as an odorant.

17,20α-P 17α,20α-dihydroxy-4-pregnen-3-one; a stereo-isomer of 17,20β-P which is released into the water by female goldfish; it is, however, 500-fold weaker (Sorensen and Scott 1994).

17,20β,21-P 17,20β,21-trihydroxy-4-pregnen-3-one; 20β-reduced form of 11-deoxycortisol; free, glucuronidated and sulphated forms released in large amounts by female goldfish; free and sulphated forms are ten times less active than 17,20β-P.

Androstenedione Released by male and female goldfish; ten times less active than 17,20β-P

Testosterone 17β-hydroxy-4-androsten-3-one; large amounts of the glucuronidated steroid released by female goldfish; negligible EOG activity of any forms in goldfish.

- 11-KT 17 β -hydroxy-4-androstene-3,11-dione; the main androgen in teleosts; negligible EOG activity.
- 17,21-P 17,21-dihydroxy-4-pregnene-3,20-dione (11-deoxycortisol); released by female goldfish; has negligible EOG activity.

MATERIALS AND METHODS

Experimental animals

Tench of both sexes (330 to 430 g, 27 to 28 cm, 2.5 years of age) were obtained from a commercial fish-farm ("Vega dal Guadiana", Badajoz, Spain). Fish were kept outside in 1000 l tanks at the Universidade do Algarve (i.e. under natural photoperiod and temperature) but not fed during the experimental period (October 2000; i.e. outside the normal spawning season); tench naturally only feed during the spring and summer months.

Recording of the electro-olfactogram (EOG)

Only male tench were used for EOG recordings (G.S.I. = 0.11 - 0.20 %); the sex of this species can be ascertained using external morphology (males have longer pelvic fins than the females, the second ray of which is markedly thickened; Wheeler 1978). The method used for recording EOGs from tench was similar to that previously described in detail for the goldfish (Hubbard et al. 2002). Briefly, tench were anaesthetised by immersion in water containing 70 mg l⁻¹ of 3-aminobenzoic acid ethyl ester (MS222) and immobilized with an intramuscular injection of the neuromuscular blocker gallamine triethiodide (1 mg kg⁻¹) in 0.9% saline. Additional doses of gallamine triethiodide were given during the experiment, if necessary (up to 3 mg kg⁻¹). The fish were then clamped in a padded Perspex stand and the gills irrigated with aerated water containing MS222 (35 mg l⁻¹). The small flap of skin covering the right nostril was cut away. The recording electrode was placed adjacent to the olfactory epithelium and the reference electrode placed lightly on the skin of the head near the nostril, and connected to earth via the headstage of the amplifier. The voltage signal was amplified using a D.C. pre-amplifier and head-stage (NL102, Digitimer Ltd., Welwyn Garden City, U.K.) and subsequently filtered above 50 Hz

(NL125, Digitimer Ltd.) and amplified (NL106, Digitimer Ltd.: final amplification x1000). The signal was then digitized (DigiData 1200, Axon Instruments, Inc., Foster City, U.S.A.) and recorded by a computer running Axoscope software (Axon Instruments, Inc.). Recording and reference electrodes were made from borosilicate glass micropipettes filled with 0.9 % NaCl and 4 % Agar (tip diameter 80 to 100 μm) connected to Ag/AgCl salt-bridge via 3 M KCl.

Preparation of stimulus solutions

All stimulus solutions were prepared freshly on the day of the experiment from stock solutions of steroids and prostaglandins (10^{-2} or 10^{-3} M in ethanol) kept at -20°C (with the exception of 17,20 β -P-SO₄ which was stored in a 50:50 mix of ethanol and distilled water). Appropriate dilutions of this stock were made with dechlorinated, charcoal-filtered tap water; the same water used to irrigate the nostril, using acid-washed glassware.

Stimulus delivery

The right nostril was constantly irrigated with dechlorinated charcoal-filtered tap water (not containing anaesthetic) under gravity (flow-rate: 6 ml min⁻¹) *via* a glass tube connected to the water reservoir. Test solutions were delivered to the tube irrigating the nasal cavity *via* a computer-operated three-way solenoid valve for a period of ten seconds.

Experimental design

Once the fish and recording electrodes were set up and in place, the optimal position for the recording electrode was determined using 10^{-5} M L-serine as stimulus. In common with the goldfish (e.g. Sorensen et al. 1987; Hubbard et al. 2002), this was generally found to be over the distal end of the raphe, with the tip of the recording electrode between two

adjacent lamellae, although the olfactory rosette of the tench has a more complex morphology than that of the goldfish, and a higher number of lamellae. The amplitude of the EOG response to 10^{-5} M L-serine ranged from -2.7 to -5.5 mV (mean = -4.0 mV). In common with studies on goldfish (Sorensen et al. 1987; Bjerselius and Olsén 1993), responses to "blank" stimuli (treated in exactly the same way as test stimuli but without addition of odorant) gave consistent EOGs similar in shape and form to responses to L-serine, except for a lower amplitude (up to 30% of response to 10^{-5} M L-serine). This was assumed to be chemical contamination, although every effort was made to minimise this; acid-washed glassware was used throughout, and the stimuli were all made up in the same water used to irrigate the nares.

Chemicals

All odorants used in this study (with the exception of L-serine) have been shown to act as pheromones in the goldfish and/or released to the water by sexually-mature female tench (Pinillos et al. 2003 - *accommpanying paper*). Glucuronidated and sulphated 17,20 β -P were purchased from Steraloids Inc. (Wilton, N.H.). All other chemicals were obtained from SigmaAldrich Chemical Co. (Sintra, Spain).

Data analysis

The peak amplitude of the initial (phasic) part of the EOG response to test solutions was measured in millivolts. All responses were then blank-subtracted. To reduce variation between the responses of individual fish, data were then normalised to the previous EOG to 10^{-5} M L-serine (these were run at regular intervals throughout the experiment). Thresholds of detection were estimated by linear regression of the concentration/response

curves to individual odorants (using only concentrations of odorant giving normalised responses significantly different to zero), and calculating the intercept on the x-axis.

RESULTS

Olfactory sensitivity to C₂₁ and C₁₉ steroids

The olfactory sensitivity of male tench to a range of C₂₁ and C₁₉ steroids, previously shown to be released by female tench and/or known to act as pheromones in the goldfish, was assessed (Figure 1). These experiments showed clearly that male tench are much more sensitive to the C₂₁ steroids (17,20 β -P, 17,20 β -P-Glu, 17,20 β -P-SO₄ and 17,20 β ,21-P) than the C₁₉ steroids (testosterone, testosterone sulphate, androstenedione), with the possible exception of 11-keto testosterone. However, male tench showed little or no olfactory sensitivity to either deoxycortisol or 17,20 α -P. Consequently, it was decided to examine the olfactory sensitivity to the C₂₁ steroids in more detail (Figure 2). The olfactory system of all male tench tested showed very strong sensitivity to 17,20 β -P, almost as much to its glucuronidated form but less so to its sulphated form, with predicted thresholds of detection of 10⁻¹² M, 10^{-11.5} M and 10^{-9.5} M respectively. The predicted threshold of detection of 17,20 β ,21-P was 10⁻¹⁰ M.

Cross-adaptation to 10⁻⁹ M 17,20 β -P

In the goldfish, the olfactory sensitivity to 17,20 β -P and its sulphated metabolite (17,20 β -P-SO₄) is mediated by distinct olfactory receptor mechanisms (Sorensen et al. 1995). To assess whether a similar situation is present in tench, a series of cross-adaptation studies were carried out wherein the amplitude of EOG responses to 17,20 β -P-Glu and 17,20 β -P-SO₄ were measured in the absence and presence of 10⁻⁹ M 17,20 β -P (Figure 3). In the presence of 10⁻⁹ M 17,20 β -P, the amplitude of responses to 10⁻⁵ M L-serine was similar to those in its presence, suggesting (unsurprisingly) that L-serine and 17,20 β -P are detected by distinct olfactory receptors. However the EOG amplitudes in response to both 17,20 β -

P-Glu and 17,20 β -P-SO₄ were severely attenuated, suggesting that all three steroids are detected by the same olfactory receptor(s).

Olfactory responses to prostaglandins

In common with many other species of fish, including other cyprinids (Stacey et al. 1996), the olfactory system of male tench was found to be highly sensitive to prostaglandin F_{2 α} (PGF_{2 α}) and its metabolite, 15-keto PGF_{2 α} (Figure 4). EOG amplitudes reached 8 and 9 mV respectively at a concentration of 10⁻⁶ M, and concentration response curves gave predicted thresholds of detection of 10^{-11.5} M (PGF_{2 α}) and 10⁻¹¹ M (15-keto PGF_{2 α}).

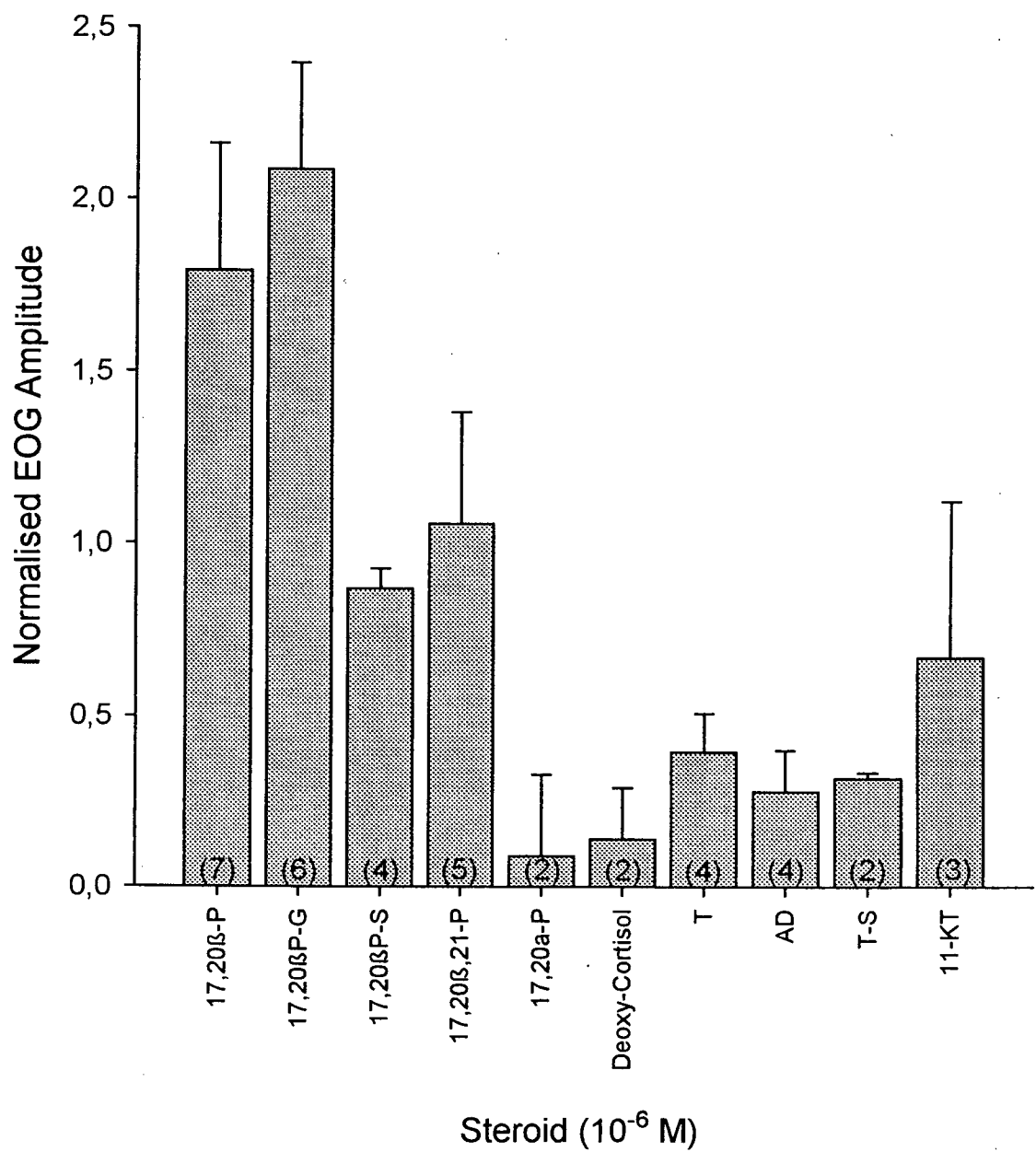


Figure 1. Histogram showing the relative olfactory sensitivity to various C₂₁ and C₁₉ steroids in male tench as assessed by EOG recordings. Data have been normalised to the response to 10⁻⁵ M L-serine, and are shown as mean ± S.E.M. (number of observations are shown in parentheses). Abbreviations are as described in the text. All steroids were applied at 10⁻⁶ M.

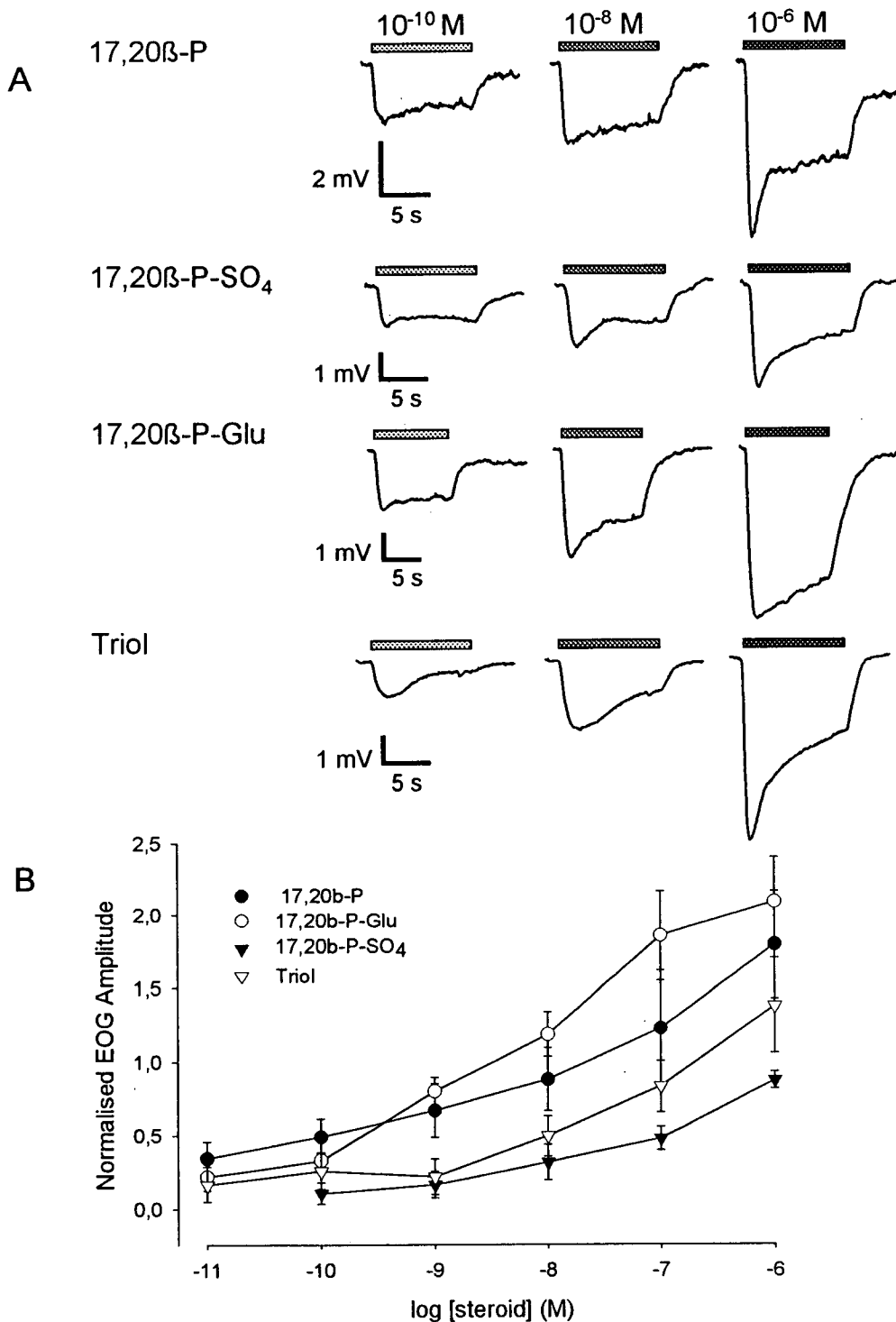


Figure 2. A. Typical EOGs recorded from male tench in response to C₂₁ steroids either released by female tench and/or previously shown to have pheromonal activity in the goldfish. For these and all following EOG traces, a downward deflection represents an increase in negativity of the signal, and all traces to the same compound were recorded from the same fish, although different compounds may have been recorded from different fish. B shows a plot of pooled normalised data (mean \pm S.E.M.; $n = 4$ to 7) to show the concentration dependency of the amplitude of the EOG response to these C₂₁ steroids. Thresholds of detection, as estimated by linear regression, are 10^{-12} M (17,20 β -P), $10^{-11.5}$ M (17,20 β -P-Glu), $10^{-9.5}$ M (17,20 β -P-SO₄) and 10^{-10} M (17,20 β ,21-P).

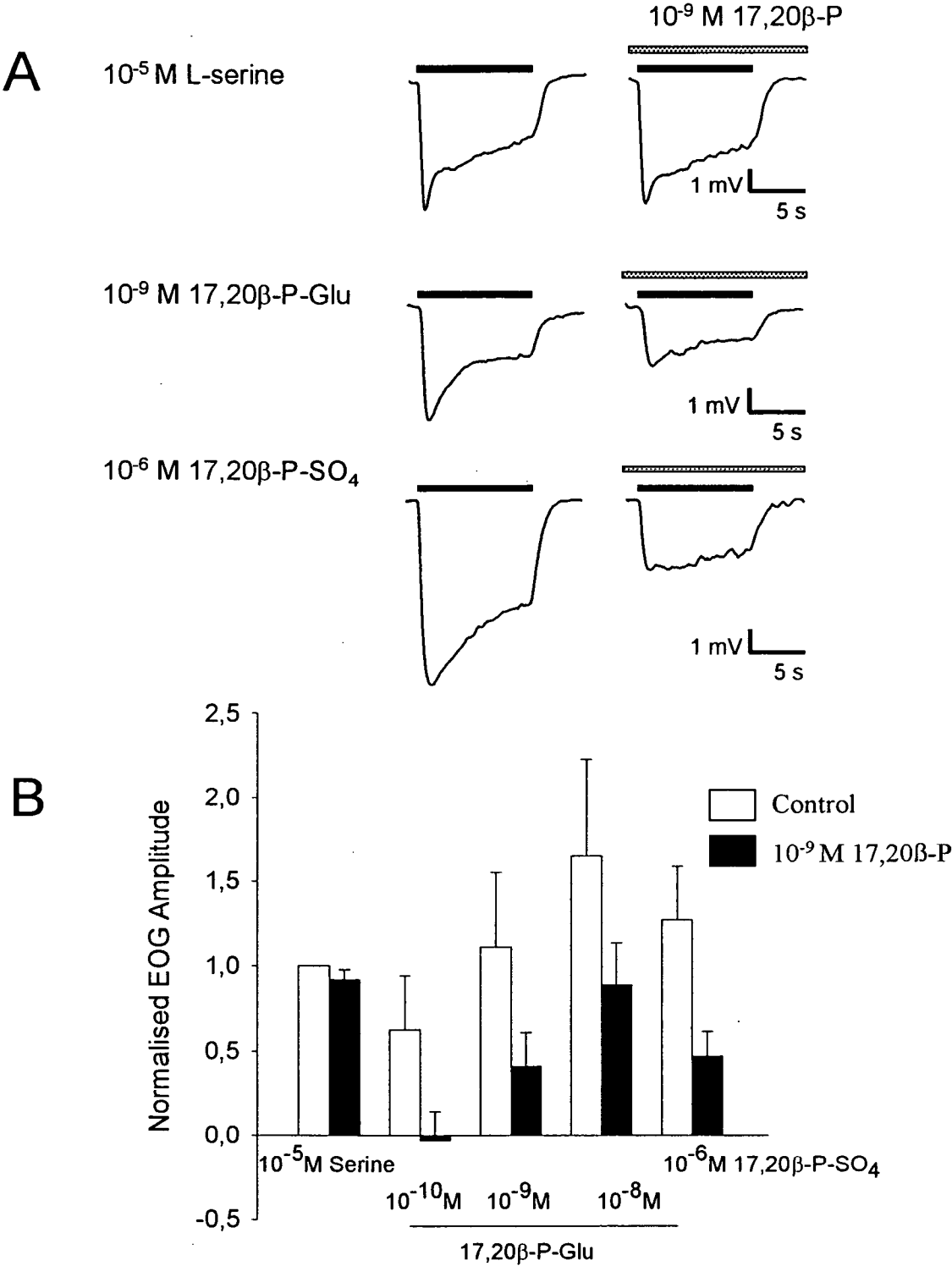


Figure 3. A. Cross-adaptation of responses to L-serine, 17,20β-P-Glu and 17,20β-P-SO₄ to 10⁻⁹ M 17,20β-P in the tench. Note that in the presence of 17,20β-P the responses to the glucuronidated form and the sulphated form are greatly attenuated, whilst the response to L-serine is unaffected, compared to respective controls. B. shows a histogram of pooled, normalised data of three similar experiments. In all cases, there was a large reduction of response amplitude to 17,20β-P-Glu and 17,20β-P-SO₄ in the presence of 10⁻⁹ M 17,20β-P (black bars), whilst the responses to L-serine were unaffected compared to controls (open bars). However, this failed to reach statistical significance due to the low number of replicates.

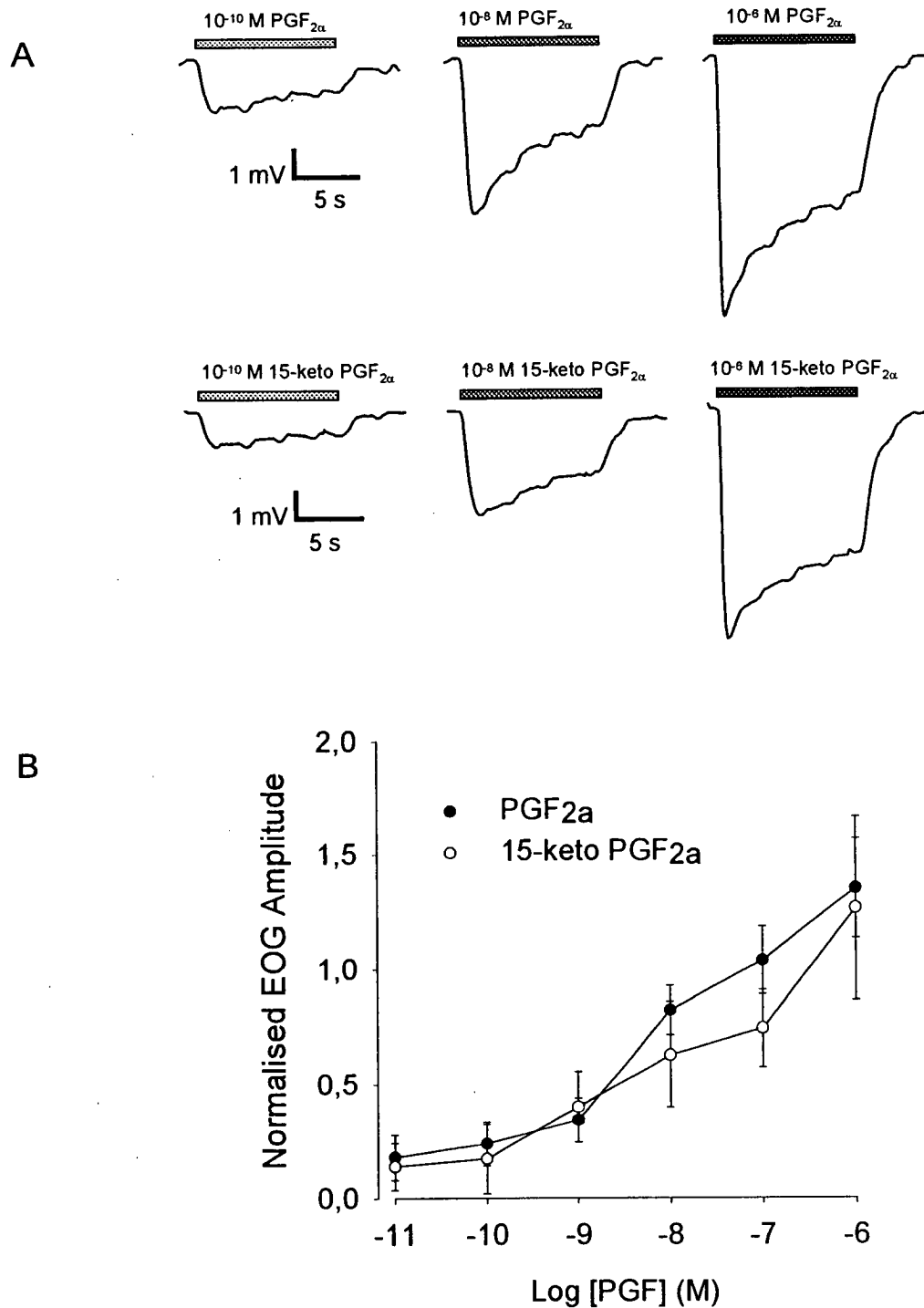


Figure 4. A. Olfactory responses of male tench to prostaglandins PGF_{2α} and 15-keto PGF_{2α}. In this case, all recordings are from the same fish. The slight undulations of the EOGs are due to small respiratory movements of the fish. B shows concentration/response curves of pooled, normalised data (n = 7; PGF_{2α}, n = 5; 15-keto PGF_{2α}). Thresholds of detection, as assessed by linear regression, were 10^{-11.5} M (PGF_{2α}) and 10⁻¹¹ M (15-keto PGF_{2α}).

DISCUSSION

As far as the authors are aware, this study is the first investigation into olfactory sensitivity of tench. The form of the EOGs obtained from tench was similar to those reported for other species of fish (e.g. Evans and Hara 1985), and similar to those obtained for the goldfish in the same laboratory (Hubbard et al. 2002); an initial sharp negative (phasic) deflection followed by a lower-amplitude, sustained tonic phase which continued as long as the stimulus was present. The amplitudes were slightly higher than those of the goldfish, although this may be due to the larger size of fish used in this study. On the other hand, it must be remembered that these studies were carried out in October, outside of the tench's natural spawning season; in some cyprinids at least, there is a seasonal variability in the size of response to sex pheromones (Irvine and Sorensen 1993).

Broadly speaking, the tench showed olfactory sensitivity to many of the goldfish sex pheromones. However, the tench showed a much higher degree of sensitivity to the glucuronide of 17,20 β -P than the goldfish. Conversely, the tench was much less sensitive to the sulphated form of 17,20 β -P. As tench frequently inhabit the same lowland still waters and slow flowing rivers as goldfish, crucian carp and common carp (all species with well documented olfactory sensitivity to 17,20 β -P) as well as other cyprinids, and spawn under similar circumstances at the same time of year, this may suggest that the species-specificity of the pheromonal message is conveyed by various (species-specific) metabolites of the main pheromone (in this case, 17,20 β -P) which may be common to several species. A species-specific metabolite (with unique olfactory sensitivity) may alert con-specifics to the main thrust of their message (17,20 β -P) in a pheromone "soup" and prevent mis-timed spawning. The present study suggests that 17,20 β -P-Glu may be the factor enabling the tench to differentiate a conspecific signal. In this respect, however, it is disappointing not only that the tench does not apparently have a distinct olfactory receptor

mechanism for the glucunoride, but also the female tench does not appear to release very much 17,20 β -P-Glu (Pinillos et al. 2003 - *accompanying paper*) in comparison to the goldfish (Scott and Sorensen 1994). The exact pheromonal roles, if any, of these compounds remain to be established in tench, and how species-specificity is conferred will be an exciting area of research.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was funded in part by grants from the Spanish Ministry of Culture (to M.L.P.) and Fundação para a Ciência e a Tecnologia (Portugal); grant No. GGP/XXI/BPD/4508/96 (to P.C.H.). The authors are grateful to the fish-farm "Vegas del Guadiana" for providing the tench.

REFERENCES

- Appelt, C.W. and Sorensen, P.W. 1999. Freshwater fish release urinary pheromones in a pulsatile manner. In: *Advances in Chemical Signals in Vertebrates*. pp. 247-256. Edited by Johnston. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Bjerselius, R. and Håkan Olsén, K. 1993. A study of the olfactory sensitivity of crucian carp (*Carassius carassius*) and goldfish (*Carassius auratus*) to $17\alpha,20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one and prostaglandin $F_{2\alpha}$. *Chem. Sens.* 18: 427-436.
- Breton, B., Horoszewicz, L., Bieniarz, K. and Epler, P. 1980a. Temperature and reproduction in tench: effect of a rise in the annual temperature regime on gonadotropin level, gametogenesis and spawning. 1. The male. *Reprod. Nutr. Develop.* 20: 105-118.
- Breton, B., Horoszewicz, L., Bieniarz, K. and Epler, P. 1980b. Temperature and reproduction in tench: effect of a rise in the annual temperature regime on gonadotropin level, gametogenesis and spawning. 1. The female. *Reprod Nutr Develop* 20: 1011-1024.
- Defraipont, M and Sorensen, P.W. 1993. Exposure to the pheromone $17\alpha,20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one enhances the behavioural spawning success, sperm production and sperm motility of male goldfish. *Animal Behaviour* 46: 245-256.
- Dulka, J.L., Stacey, N.E., Sorensen, P.W. and Van Der Kraak, G.J. 1987. A steroid sex pheromone synchronizes male-female spawning readiness in goldfish. *Nature* 325: 251-253.
- Evans, R.E. and Hara, T.J. 1985. The characteristics of the electro-olfactogram: its loss and recovery following olfactory nerve section in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Brain Res.* 330: 65-75.

- Hubbard, P.C., Barata, E.N. and Canário, A.V.M. 2002. Possible disruption of pheromonal communication by humic acid in the goldfish, *Carassius auratus*. *Aquat. Toxicol.* 60: 169-183.
- Irvine, I.A.S. and Sorensen, P.W. 1993. Acute olfactory sensitivity of wild common carp, *Cyprinus carpio*, to goldfish hormonal sex pheromones is influenced by gonadal maturity. *Can. J. Zool.* 71: 2199-2210.
- Kitamura, S., Ogata, H. and Takashima, F. 1994. Olfactory responses of several species of teleost to F-prostaglandins. *Comp. Biochem. Physiol. A* 107: 463-467.
- Muus, B.J. and Dahlstrom, P. 1971. *Collins Guide to the Freshwater Fishes of Britain and Europe*. Collins, London.
- Pinillos, M.L., Guijarro, A.I., Delgado, M.J. and Scott, A.P. 2003. Changes in plasma and water sex steroid concentrations in male and female tench *Tinca tinca* in response to injection of gonadotropin-releasing hormone. *Fish Physiol. Biochem.* (submitted - accompanying paper).
- Poling, K.R., Fraser, E.J., and Sorensen, P.W. 2001. The three steroidal components of the goldfish preovulatory pheromone signal evoke different behaviors in males. *Comp. Biochem. Physiol. B* 129: 645-651.
- Scott, A.P. and Sorensen, P.W. 1994. Time course of release of pheromonally active gonadal steroids and their conjugates by ovulatory goldfish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 96: 309-323.
- Sorensen, P.W. and Goetz, F.W. 1993. Pheromonal and reproductive of F prostaglandins and their metabolites in teleost fish. *J. Lipid Mediator.* 6: 385-393.
- Sorensen, P.W., Hara, T.J., Stacey, N.E. and Goetz, F.W.M. 1988. F prostaglandins function as a potent olfactory stimulus that comprise the postovulatory female sex pheromone in goldfish. *Biol. Reprod.* 39: 1039-1050.

- Sorensen, P.W., Hara, T.J., and Stacey, N.E. 1987. Extreme sensitivity of mature and gonadally regressed goldfish to a potent steroidal pheromone, 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one. *J. Comp. Physiol. A* 160: 305-313.
- Sorensen, P.W., Hara, T.J., Stacey, N.E. and Goetz, F.W.M. 1988. F prostaglandins function as potent olfactory stimulants that comprise the postovulatory female sex pheromone in goldfish. *Biol. Reprod.* 39: 1039-1050.
- Sorensen, P.W. and Scott, A.P. 1994. The evolution of hormonal sex pheromones in teleost fish: poor correlation between the pattern of steroid release by goldfish and olfactory sensitivity suggests that these cues evolved as a result of chemical spying rather than signal specialization. *Acta Physiol. Scand.* 152: 191-205.
- Sorensen, P.W., Scott, A.P., Stacey, N.E. and Bowdin, L. 1995. Sulfated 17,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one functions as a potent and specific olfactory stimulant with pheromonal actions in the goldfish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 100: 128-142.
- Stacey, N. E. and Cardwell, J. R. 1997. Hormonally-derived sex pheromone systems in fish: new approaches to controlled reproduction. In: *Recent Advances in Marine Biotechnology*, pp. 407-454. Edited by M. Fingerman, R. Nagabhushanam and M.F. Thompson. Oxford-IBH, New Delhi.
- Stacey, N., Cardwell, J. and Murphy, C. 1996. Hormonal pheromones in freshwater fishes: Preliminary results of an electro-olfactogram survey. In: *Fish Pheromones: Origins and Modes of Action*. pp. 47-55. Edited by A.V.M. Canario and D.M. Power. Universidade do Algarve, Faro.
- Stacey, N.E. and Sorensen, P.W. 1986. 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one: a steroidal primer pheromone increasing milt volume in the goldfish, *Carassius auratus*. *Canad. J. Zool.* 64: 2412-2417.

- Stacey, N.E., Sorensen, P.W., Dulka J.G., Cardwell, J.R., and Irvine, A.S. 1991. Fish sex pheromones: current status and potential applications. Bull. Inst. Zool. Academica Sinica Monogr. 16: 189-227.
- Stacey, N.E., Sorensen, P.W., Van Der Kraak, G.J. and Dulka, J.G. 1989. Direct evidence that $17\alpha,20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one functions as a goldfish primer pheromone: Preovulatory release is closely associated with male endocrine responses. Gen. Comp. Endocrinol. 75: 62-70.
- Steffens, W. 1995. The tench (*Tinca tinca* L.), a neglected pond fish species. Polskie Archiwum Hydrobiologii 42: 161-180.
- Wheeler, A. 1978. Key to the Fishes of Northern Europe. Frederick Warne (Publishers) Ltd., London.

6. Capítulo IV

“Incorporación de esteroides sexuales disueltos en el agua en relación con su afinidad por las proteínas transportadoras de esteroides en *Tinca tinca*”

6.1 Objetivos y diseño experimental

En los capítulos II y III hemos descrito la dinámica de liberación de esteroides en torno al momento de la oviposición. Tanto en *Salvelinus* como en *Tinca* observamos que el patrón de liberación de esteroides al agua tras la estimulación con los análogos de GnRH sigue fielmente al patrón de cambios observados en el plasma. No obstante, en la tenca hemos encontrado que la dinámica de liberación no es igual para todos los esteroides. Así, en el caso del esteroide de 21 átomos de carbono, 17,20 β -dihidroxi-4-pregnen-3-ona (17,20 β -P) sí existe una relación directa entre su concentración plasmática y la cantidad liberada al agua, pero no sucede de este modo para la testosterona, que aparentemente se libera a menor tasa que el 17,20 β -P (una relación seis veces inferior). Una situación muy semejante observaron Scott y Sorensen (1994) en otro ciprínido, el carpín (*Carassius auratus*), y la hipótesis principal que estos autores plantean para justificar esta disparidad es una diferente afinidad de las SSBPs por ambos esteroides, que sería obviamente muy superior para la testosterona que para la 17,20 β -P.

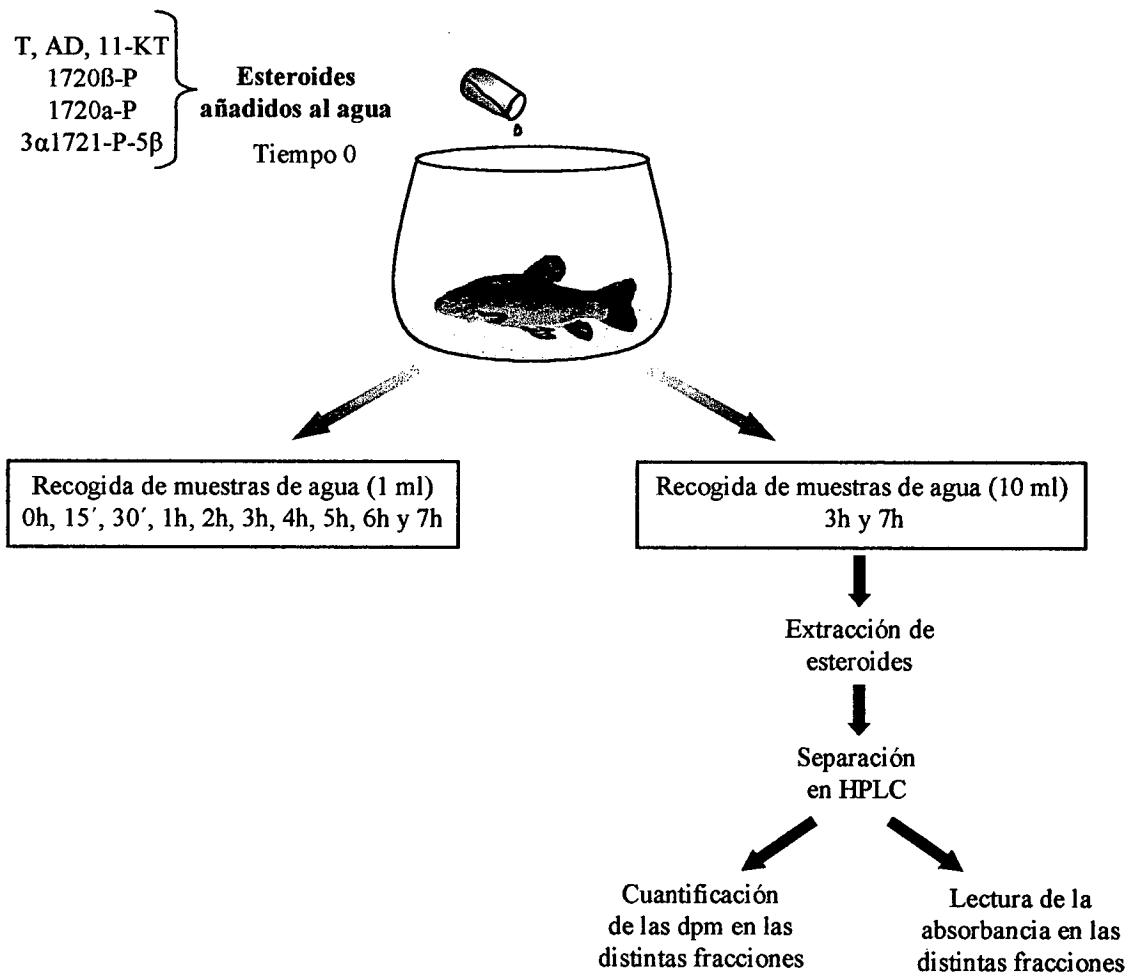
Teniendo en cuenta estudios previos realizados en la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) y en el carpín (*Carassius auratus*) (Vermeirssen y Scott, 1996); Sorensen *et al.*, 2000), en los que se muestra que los esteroides libres (no conjugados) se liberan al agua por las branquias y que, al menos un esteroide, la 17,20 β -P, es captado del agua por la misma ruta; supusimos que, en relación con el paso de esteroides, las branquias están actuando como una membrana que separa dos líquidos (plasma y agua), permitiendo un movimiento pasivo de moléculas en ambos sentidos. Por lo tanto, asumimos que, así como a mayor afinidad de unión de SSBPs por esteroides, menor liberación de éstos al agua, el paso de esteroides en el otro sentido, es decir del agua al interior del pez, se vería favorecido en el caso de esteroides por los que las SSBPs presenten una gran afinidad de unión.

Con el objetivo de demostrar si existe dicha relación entre la tasa de liberación de esteroides al agua y su afinidad por las SSBPs, nos planteamos la ejecución del presente trabajo en el ciprínido *Tinca tinca*. En primer lugar, teniendo en cuenta que los esteroides pueden pasar en ambos sentidos a través de las branquias, analizamos en un intervalo de tiempo predeterminado las cantidades de testosterona, androstenediona, 11-cetotestosterona, 17,20 β -dihidroxi-4-pregnen-3-ona, 17,20 α -dihidroxi-4-pregnen-3-ona, 3 α ,17,21-trihidroxi-5 β -pregnan-20-ona que son captadas del agua por tencas sexualmente maduras. En segundo lugar, realizamos un estudio de las características de la unión de las

SSBPs a dichos esteroides en el plasma de la tenca.

El análisis de la tasa de incorporación de los esteroides presentes en el agua se realizó con 10 ejemplares sexualmente maduros, 5 hembras y 5 machos, que tras ser pesados eran colocados individualmente en bolsas de polietileno que contenían 3 litros de agua a la que se añadían los esteroides marcados radiactivamente con tritio. Con el fin de evaluar la posible adherencia de los esteroides ensayados a las paredes de la bolsa, incluimos en el diseño experimental dos bolsas en las mismas condiciones que las anteriores pero sin peces en su interior. Tras la adición del esteroide marcado se recogieron muestras de agua (1 ml) a tiempo cero y en los siguientes intervalos: 15 y 30 min, 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 h, muestras en las que se midió el número de desintegraciones por minuto (dpm). Además, a fin de establecer el posible grado de metabolización de los esteroides durante el transcurso del experimento, se recogieron muestras de agua a las 3 y a las 7 h, en las cuales se extrajeron los esteroides, que fueron resuspendidos con el esteroide estándar radioinerte. A continuación, se realizó una separación fraccional en columnas de HPLC de fase reversa, midiendo la radiactividad en fracciones de 1 min y la absorbancia de cada una de estas fracciones (para más detalles metodológicos, véase el apartado de material y métodos del artículo 6). Finalmente, a las 7 h del inicio del experimento se extrajeron muestras de sangre y, tras el sacrificio de los animales, se extirpó la vesícula biliar con el fin de cuantificar el número de dpm en el plasma y en el jugo biliar.

En segundo lugar, con el fin de analizar las características de unión de las SSBPs a los esteroides sexuales, realizamos varios ensayos a partir de muestras de sangre de tencas macho maduras. Una descripción detallada de los procedimientos aparece en el apartado de material y métodos del artículo 6 en la presente Memoria. Brevemente, en primer lugar se puso a punto el ensayo que nos permitiría cuantificar la capacidad del plasma de la tenca para unir distintos esteroides sexuales, y a continuación se realizaron los análisis de saturación, con el fin de determinar la constante de afinidad (K_d) y la capacidad de unión máxima (B_{max}) de las SSBPs por la testosterona y androstenediona. Posteriormente, se realizó el análisis de la especificidad de la unión para determinar la especificidad relativa de las SSBPs por los distintos esteroides y finalmente la cinética de la unión proteínas-esteroides, con el fin de obtener los coeficientes de asociación y disociación.



Esquema 11. Diseño experimental para la cuantificación de la incorporación de esteroides disueltos en el agua por la tenca.

6.2. Artículo 6

**“THE RATE OF UPTAKE OF SEX STEROIDS FROM WATER BY TENCH
TINCA TINCA L. IS INFLUENCED BY THEIR AFFINITY FOR PLASMA SEX
STEROID BINDING PROTEIN”**

M. L. PINILLOS AND A. P. SCOTT

*The Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science, Barrack Road,
Weymouth, Dorset, DT4 8UB, UK*

Author for correspondence:

A. P. Scott, (Fax: +44 (0) 1305 206601; E-mail: a.p.scott@cefas.co.uk)

EN FASE FINAL DE PREPARACIÓN DEL MANUSCRITO

ABSTRACT

The aim of this study was to test the hypothesis that the rate at which steroids are taken up from water by fish is related to their affinity for sex steroid binding proteins in the plasma. This is a first step towards trying to establish why fish release some steroids into the water more readily than others. The fish on which the study has been carried out is the tench *Tinca tinca* L., for which information is available on water and plasma concentrations of testosterone (T), 11-ketotestosterone (11-KT), androstenedione (AD), estradiol (E₂), 17,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (17,20 β -P) and 17,20 α -dihydroxy-4-pregnen-3-one (17,20 α -P) in sexually mature males and females. Male and female tench were placed in individual containers and tritiated steroids then added to the water. Water samples were collected over the next 7 h and the fish then sacrificed, bled and the gall bladder removed. Radioactivity was counted in all the samples. The radioactivity of 11-KT and 3 α ,17,21-trihydroxy-5 β -pregnan-20-one (3 α ,17,21-P-5 β ; used as a 'control' because it is not found in tench) remained virtually undepleted in the water over the course of the experiment. The radioactivity of 17,20 β -P and 17,20 α -P decreased by 20% and 22% after 7 h; and T and AD by 50% and 53%. HPLC analysis of water samples at 3 h indicated that none of the steroids were extensively metabolised during the experiment. The amounts of radioactivity that were recovered from the gall bladder and plasma were positively correlated with the rate of disappearance of radioactivity from the water. The ability of the steroids to bind to plasma proteins was tested by incubating plasma with radioactive steroids and then separating bound and free with cold dextran-coated charcoal. With plasma at a dilution of 1:16 (v/v), T and AD were bound >50% and all the other steroids <10%. Saturation analysis established dissociation constants of 3 ± 0.4 and 1.4 ± 0.2 nM and binding capacities of 171 ± 20 and 149 ± 24 nM for T and AD, respectively. The ability of steroids to displace tritiated T and AD from the binding protein was in the rank

order $AD > T > E_2 > 17,20\alpha P = 11-KT > 17,20\beta-P > 3\alpha,17,21-P-5\beta$. While not exactly in the same rank order as the rate of uptake of the steroids, these data strongly suggest that the affinity of steroids for plasma binding proteins is an important factor in controlling the rate at which they are taken up and probably also released into the water.

INTRODUCTION

It is well established that many species of teleost release a variety of steroids into the water where some act as sex pheromones (Stacey, 1991; Poling *et al.*, 2001). Pheromones play a pivotal role in synchronising oviposition and the release of sperm to ensure optimum fertilisation (Poling *et al.*, 2001). The dynamics of steroid release around and about the time of spawning has been studied in two cyprinids – the goldfish *Carassius auratus* L. (Stacey *et al.*, 1989; Scott & Sorensen, 1994) and tench *Tinca tinca* L. (Pinillos *et al.*, 2003b). Both studies found that the pattern of change of steroids in the water followed their pattern of change in the plasma. However, while concentrations of testosterone (T) were higher or similar to those of 17,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (17,20 β -P) in the plasma, they were far lower than those of 17,20 β -P in the water (i.e. T appears to be released far less readily into the water than 17,20 β -P). It was proposed by Scott & Sorensen (1964) that this might be related to the fact that there is a sex steroid binding protein (SSBP) in fish plasma that has been shown (in all species where the two steroids have been studied) to have a much higher affinity for T than 17,20 β -P (Fostier & Breton 1975; Pasmanik & Callard 1986; Laidley & Thomas 1994; Chang & Lee, 1992). Steroid binding proteins have been proposed to protect steroids from rapid metabolic clearance (Plymate *et al.* 1990) and to modulate steroid availability and uptake by target tissues (Pardridge, 1981).

Although our primary objective is to unravel the link between plasma binding protein activity and the rate of release of steroids, we have chosen to examine (not least because the experiments are easier to design and execute) the link between plasma binding protein activity and the rate of uptake of steroids. The factor that links release and uptake of steroids is that both activities appear to take place across the gills. Vermeirssen & Scott (1996) and Sorensen *et al.* (2000), showed in rainbow trout and goldfish, respectively, that

free steroids (i.e. those that are not conjugated to a sulphate or glucuronide group) were released into the water via the gills; and Vermeirssen & Scott (1996) showed that at least one steroid, 17,20 β -P, was taken up by the same route. If one makes the assumption that, as far as the passage of steroids go, the gills act like a membrane passively separating two liquids (water and plasma), then one would expect that, if binding proteins are able to slow down the passage of steroids from plasma to water, then they should be equally able to accelerate their passage in the opposite direction. This we have set out to establish in the tench, a multispawning cyprinid which is widely distributed in Europe where it has been cultivated since the Middle Ages (Steffens, 1995). The steroids that we have included in the study are, with one exception, those that are known to be present in plasma of both male and female tench (Pinillos *et al.*, 2003a) and also to be released into the water (Pinillos *et al.*, 2003b).

MATERIALS AND METHODS

FISH

Tench of both sexes (88.6 ± 3.5 g) were purchased in February 2001 from Framlingham Fisheries, Suffolk, UK. They were transferred to CEFAS, Lowestoft and kept inside for a period of two weeks under 10L:14D photoperiod and 17 °C temperature, in 500 l tanks which had a constant flow of aerated, dechlorinated water. Fish were not fed for 7 days before or during the experimental period.

STEROID UPTAKE EXPERIMENTS

Five males and five females were used in each experiment. After weighing, each fish was placed in a polyethylene bag filled with 3 L of aerated water at 17 °C. The fish were held in these conditions for 1 h and then radioactive T, 17,20 β -P, androstenedione

(AD), 11-ketotestosterone (11-KT), 17,20 α -dihydroxy-4-pregnen-3-one (17,20 α -P) or 3 α ,17,21-trihydroxy-5 β -pregnan-20-one (3 α ,17,21-P-5 β) added to the water (between 1000 to 2000 dpm per ml). Water samples (1 ml) were collected at 0, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h and 7 h after the addition of radioactive steroid to the water. The water samples were mixed with 7 ml Optiphase Hisafe II scintillation fluid and counted to 2% precision. Two bags with water plus radioactive steroid only were included in each experiment (to control against the possibility that steroid disappeared from the water by binding to the walls of bags or the aerators).

After the final water collection, a blood sample was withdrawn, the fish sacrificed by a blow to the head and the gall bladder (and contents) removed. Radioactivity in the plasma and gall bladder was measured.

In order to establish the degree of metabolism of the steroids during the course of the experiment, 10 ml water samples were collected at 3 h. These were stored frozen at -20 °C and, at a later date, thawed out and passed through Sep-pak C18 extraction cartridges as described previously (Scott & Sorensen, 1994). The cartridges were washed with 5 ml distilled water, eluted with methanol and dried down at 45°C under a stream of nitrogen. The residues were mixed with 10 μ g of non-radioactive standard steroid, redissolved in a mixture of 50 μ l ethanol and 50 μ l 10nM Tris (pH 7.6) and then loaded onto a 5 μ m C₁₈ reverse phase HPLC column (4.6 mm x 250mm) with a gradient consisting of 20 % acetonitrile in 0.01 % trifluoroacetic acid (TFA) for 5 min, followed by a linear rise from 20 to 70% acetonitrile in 0.01% TFA for 50 min. The flow rate was 0.5 μ l/min; 1 min fractions were collected and mixed with scintillation fluid for counting. The effluent was monitored at 248 nm for all 4-pregnene steroids and 200 nm for 3 α ,17,21-P-5 β .

STEROIDS

All radioactive steroids were purchased from Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK. Those that were used without further modification were: [1,2,6,7-³H]testosterone (3.59 TBq/mmol); androst-4-ene-3,17-dione (3.70 TBq/mmol); 17 α -hydroxy[1,2,6,7-³H]-4-pregnene-3,20-dione (17-P; 2.85 TBq/mmol); 11-keto[³H]testosterone (11-KT; 4.26 TBq/mmol; custom synthesised); 3 α ,17 α ,21-trihydroxy-5 β -[³H]pregnan-20-one (17,21-P-5 β ; 340 GBq/mmol; custom synthesised). Tritiated 17,20 α -P and 17,20 β -P were made by enzymatic reduction (Scott *et al.*, 1982; Canario & Scott, 1989) of tritiated 17-P.

PLASMA BINDING STUDIES

Blood samples were collected into a heparinised syringe from the caudal vein of mature male tench and centrifuged at 1000 g for 5 min. Plasma was removed, made into two pools (male and female) and stored in aliquots at -20°C. Some plasma was 'stripped' of endogenous steroids by incubating overnight with an equal volume of 5 mg ml⁻¹ dextran-coated charcoal solution (DCC) followed by centrifugation at 1000 g for 12 min. The supernatant was decanted and used for assays. After it was established that DCC treatment did not affect the results, this step was abandoned.

Plasma protein was determined by the Bradford protein assay (Biorad) using bovine serum albumin as a standard.

Untreated plasma was diluted (1/2 to 1/512) in 50mM sodium phosphate buffer pH 7.6 containing 0.1% gelatin and incubated overnight at 4 °C with about 10,000 dpm per tube of tritiated steroid. Next morning, the tubes were placed in ice. Bound and unbound radioactivity were separated by addition of 1 ml of DCC. The tubes were then centrifuged

for 12 minutes at 1000g at 4 °C. The supernatant was transferred to a vial, mixed with scintillation fluid and counted.

Binding affinity and maximum number of binding sites were determined by incubating 150 µl of plasma diluted 1/50 (v/v), with 100 µl of increasing concentrations (0.05-25 nM) of tritiated T or AD in the presence of 1,500 nM of radioinert steroid as competitor (to measure non-specific binding) or 50µl phosphate buffer (to measure total binding) overnight at 4°C. Specific binding was determined by subtracting non-specific from total binding. The affinity constant (K_d) and capacity (B_{max}) were determined by using the non-linear transform utility of Sigmaplot Scientific Graphing Software (Jandel GmbH) to fit specifically bound steroid (B_s) against free steroid (F) to a single rectangular hyperbola: $[B_s] = (B_{max} \cdot [F]) / (K_d + [F])$.

To investigate specificity, diluted plasma (1/16) was incubated with 0.2 nM radiolabelled T or AD with or without increasing concentrations (7 nM to 115 nM) of radioinert 1720β-P, 11-KT, 17,20α-P, E_2 , AD and T overnight at 4°C.

The rate of steroid association was determined by measuring the specific binding of labelled T and AD after an incubation period of 30 sec to 25 min. For determining the rate of dissociation, plasma samples were incubated with tritiated T or AD overnight and then the excess unlabelled steroid was added for 30 sec to 25 min before the separation with charcoal.

RESULTS

STEROID UPTAKE

For all steroids, the amounts of radioactivity in water that contained no fish remained stable throughout the course of experiment (results not shown). However, in the presence of a fish, radioactivity of some steroids disappeared substantially faster than

others (Fig. 1). There were only slight differences between males and females in the pattern of uptake of the steroids. AD and T disappeared from the water at the greatest rate (between 50% and 60% after 7 h); 17,20 β -P and 17,20 α -P at a moderate rate (20% to 25%); 11-KT and 3 α ,17,21-P-5 β hardly at all (<10%).

For each steroid, the amount of radioactivity recovered in the gall bladder (as a percentage of the total amount of activity that had been added to each bag) showed a close correspondence to the rate of uptake (Fig. 2). The same pattern was evident for plasma (Fig. 2). The average concentration of radioactivity (dpm/ml) in water and plasma (both collected at 7 h) is shown in Table 1. This shows that radioactivity of all steroids was more concentrated in plasma than in water – ranging from over 300-fold with AD to 2-fold with 3 α ,17,21-P-5 β .

When pooled water samples collected at 3 h were fractionated on HPLC, the recovery of radiolabel in the fractions that co-eluted with the standards was: T, 88%; AD, 98%; 17,20 β -P, 90%; 17,20 α -P, 86%; 11-KT, 80%; 3 α ,17,21-P-5 β , 96%. Only 11-KT was assessed at 7 h and the percent recovery remained unchanged.

BINDING OF STEROIDS TO PLASMA PROTEINS

When tritiated steroids were incubated with different dilutions of plasma (Fig. 3), only AD and T bound strongly (>50% at a dilution of 1/50). All other steroids bound <5%.

Specific binding of plasma to radioactive T (Fig. 4) and AD (Fig. 5) increased with increasing amounts of the radiolabel from 1 nM to 20 nM. The average binding values obtained from 8 different pools of plasma (from both males and females) were: AD, $K_d = 1.4 \pm 0.2$ nM, $B_{max} = 149 \pm 24$; T, $K_d = 3 \pm 0.4$ nM, $B_{max} = 171 \pm 20$ nM.

The relative effectiveness of different steroids in displacing radioactive label was similar for both T and AD (Fig. 6). The rank order was $AD > T > E_2 > 17,20\alpha\text{-P} = 11\text{-KT} > 17,20\beta\text{-P} > 3\alpha,17,21\text{-P-5}\beta$.

Association and dissociation rates for T and AD were < 1 min (data not shown) and could thus not be determined accurately.

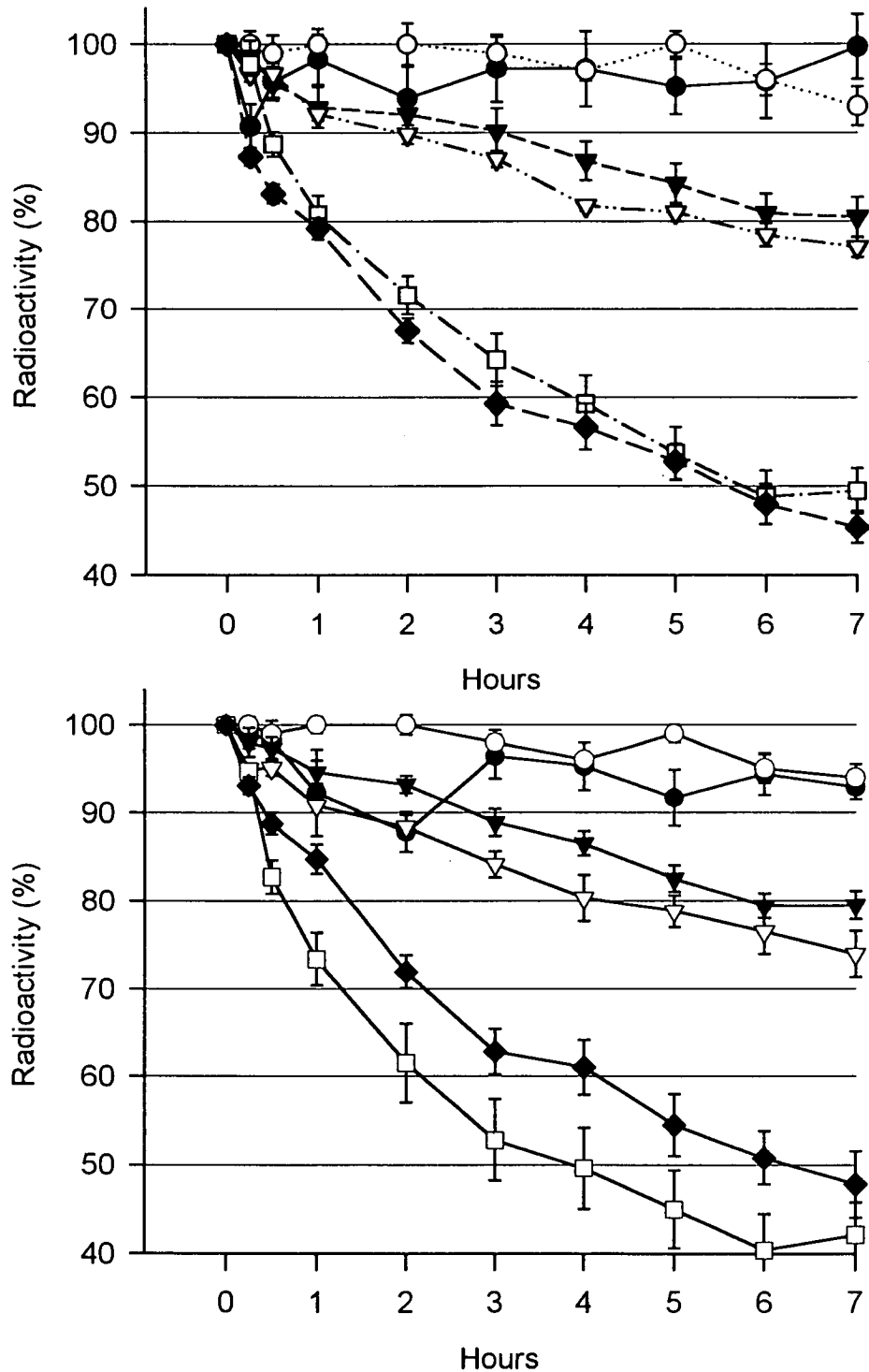


Figure 1. Cumulative percentage of initial radioactivity remaining in water in bags containing either male (upper graph) or female (lower graph) tench - following addition of tritiated $3\alpha,17,21\text{-P}_5\beta$ (●), 11-KT (○), $17,20\alpha\text{-P}$ (▼), $1720\beta\text{-P}$ (▽), AD (□) or T (◆). The bars represent S. E. M.

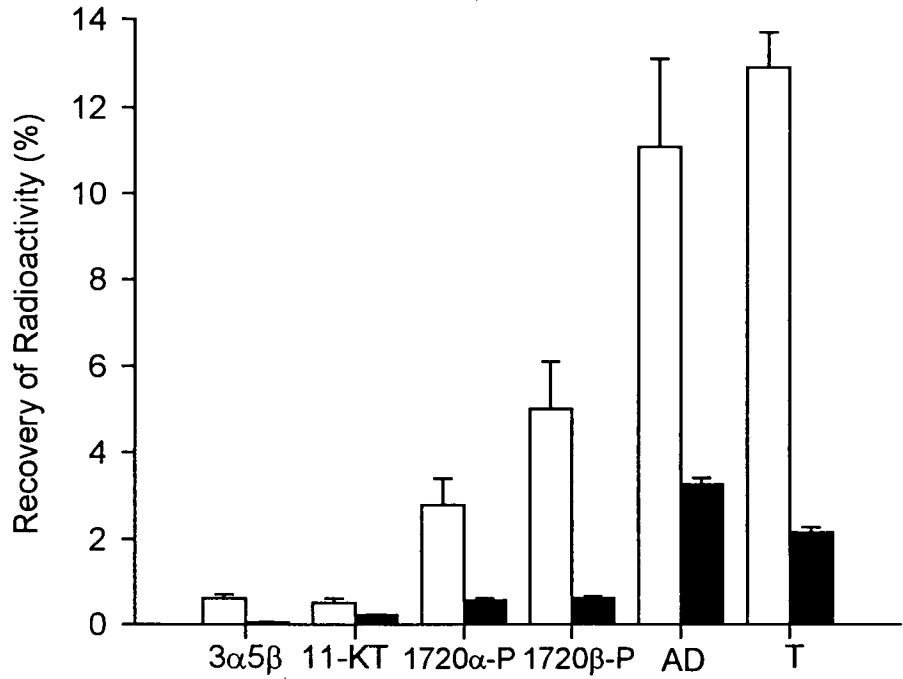




Figure 2. Percentage of initial total radioactivity recovered in the gall bladder  and plasma  of tench after 7 h.

Steroid	Water (dpm/ml)	Plasma (dpm/ml)	Ratio plasma:water
AD	528	165,089	313
T	726	106,654	147
17,20 β -P	1,185	30,564	26
17,20 α -P	1,088	25,490	23
11-KT	1,214	8,806	7.3
3 α ,17,21-P-5 β	2,607	4,765	1.8

Table 1. Concentrations (dpm/ml) of radioactive steroids in plasma and water at the end of the experiment

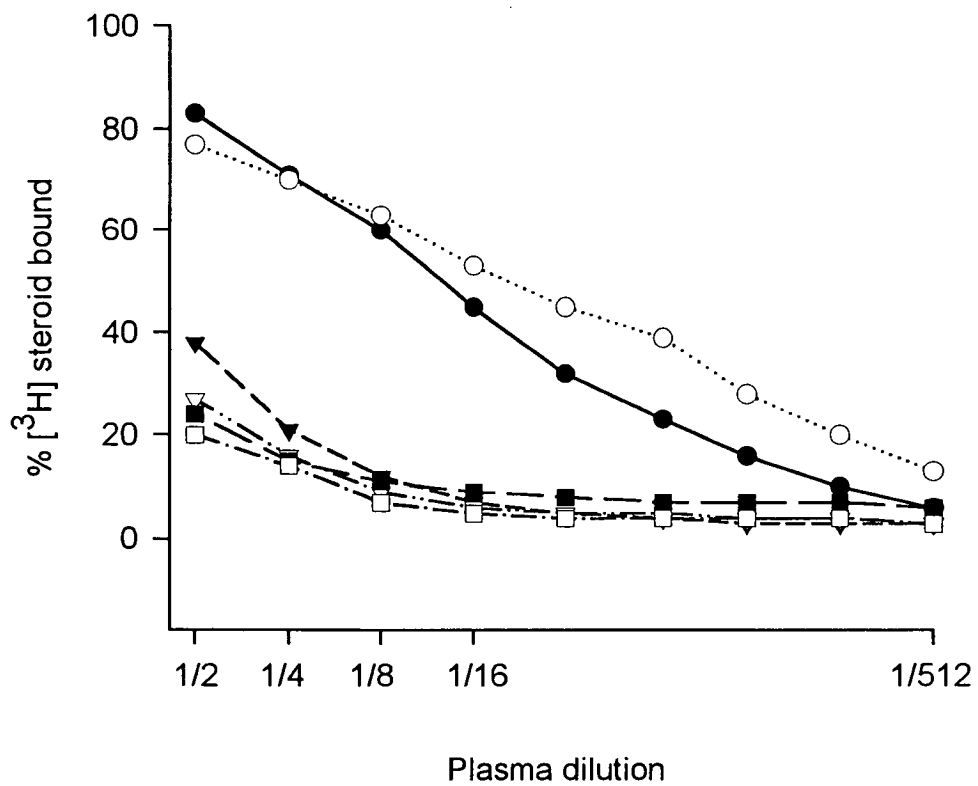


Figure 3. Effectiveness of different dilutions of male plasma in binding radioactive AD (●), T (○), 17,20α-P (▼), E₂ (▽), 11-KT (■), 17,20β-P (□).

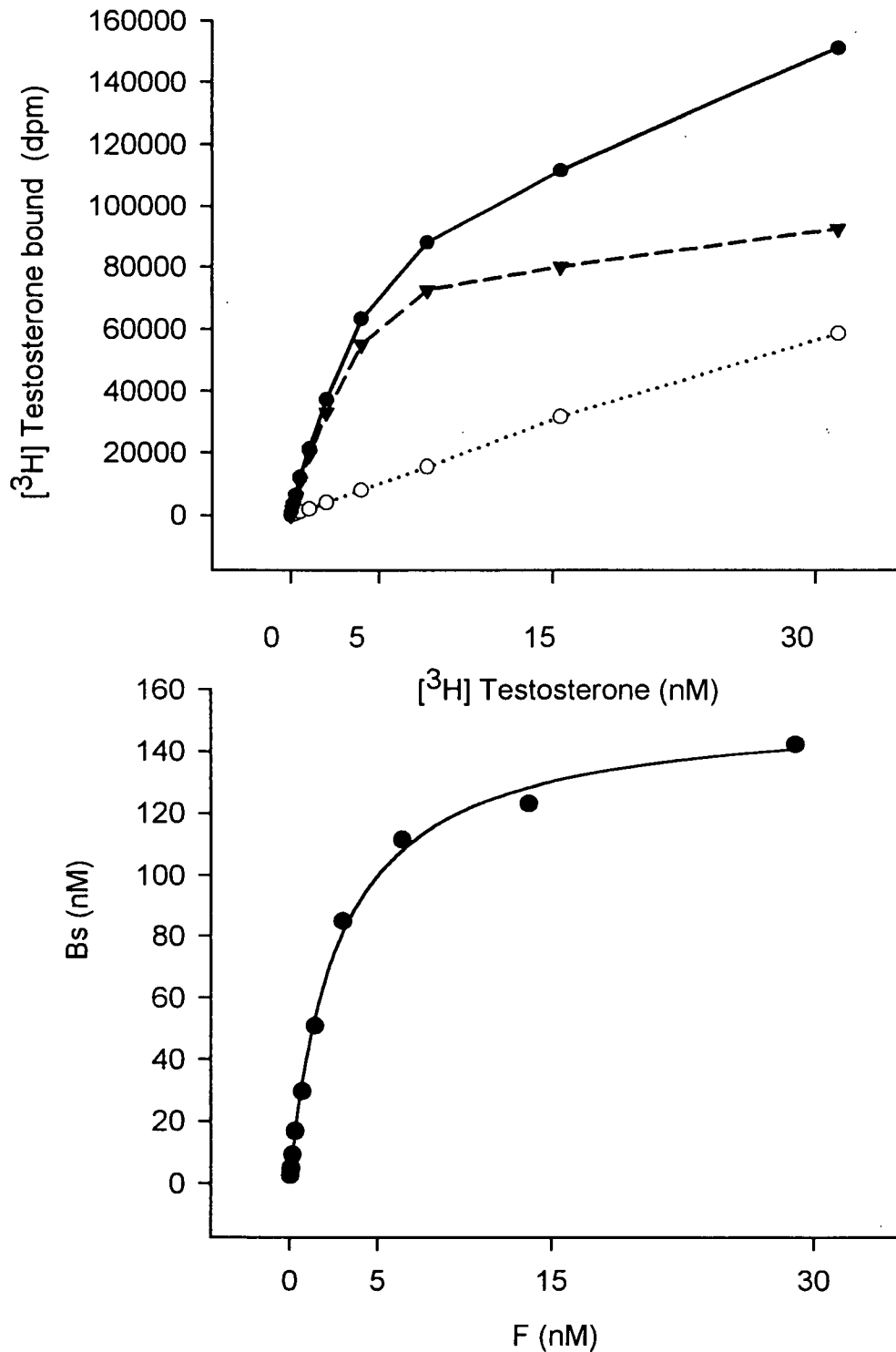


Figure 4. Representative saturation curve (top graph) (●) total binding, (○) non specific binding, (▼) specific binding and rectangular hyperbola plot (bottom graph) for binding of T by male plasma at a dilution of 1/50 (v/v). The plasma was incubated with graded amounts of $[^3\text{H}]$ -T with or without 1,500 nM unlabelled T.

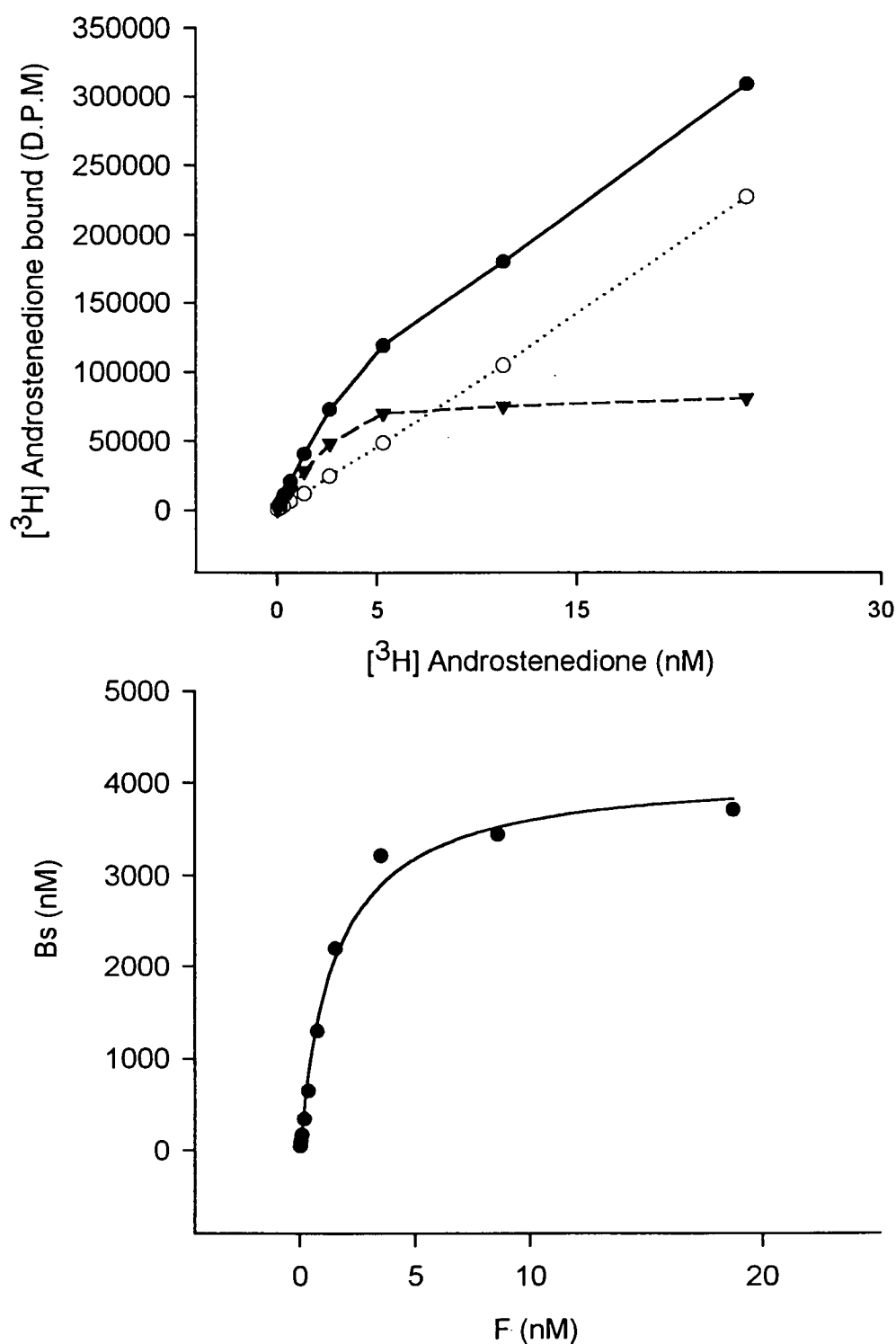


Figure 5. Representative saturation curve (top graph) (●) total binding, (○) non specific binding, (▼) and rectangular hyperbola plot (bottom graph) for binding of AD by male plasma at a dilution of 1/50 (v/v). The plasma was incubated with graded amounts of $[^3\text{H}]$ -AD with or without 1,500 nM unlabelled AD.

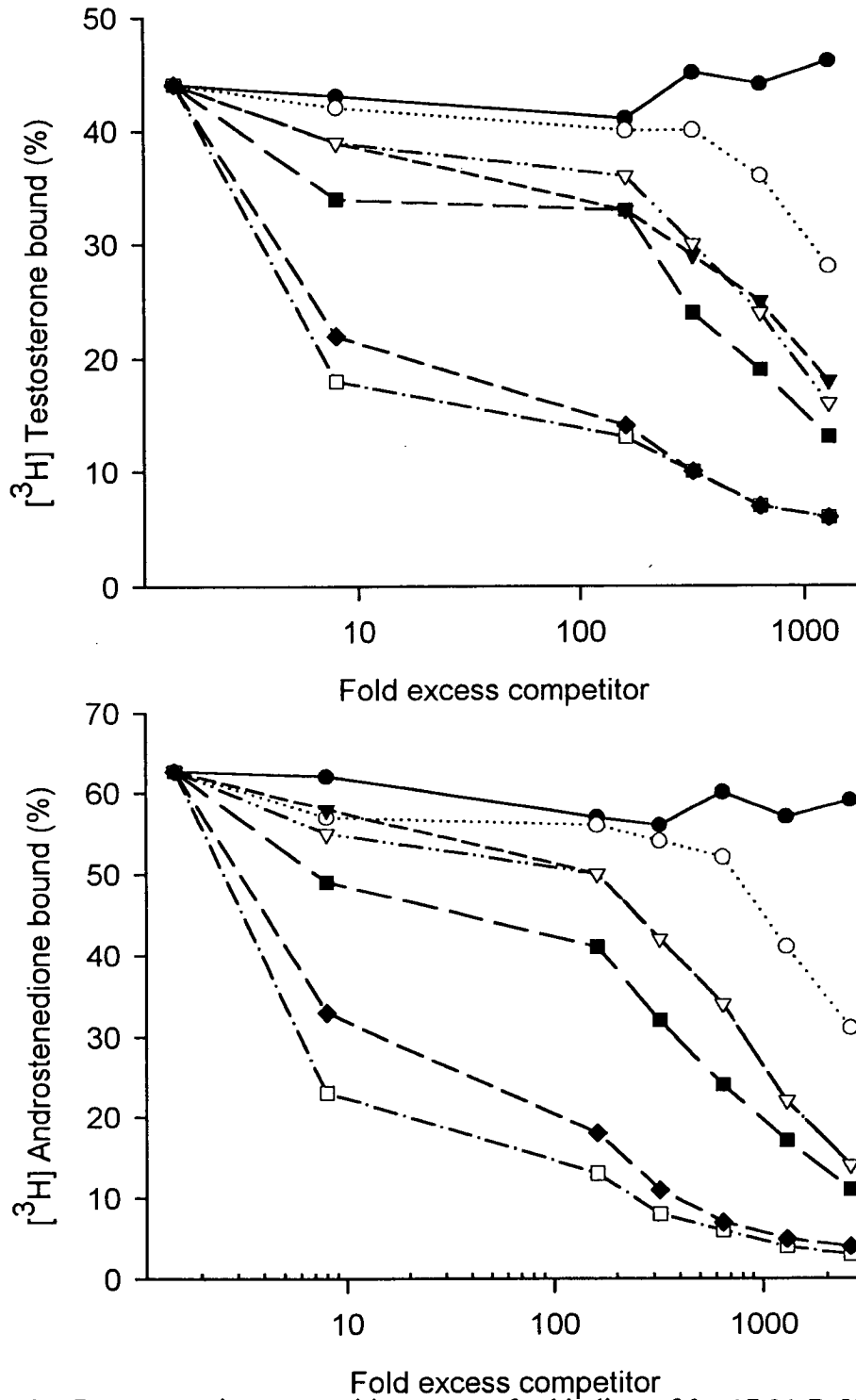


Figure 6. Representative competition curves for binding of 3α,17,21-P-5β (●), 1720β-P (○), 11-KT (▼), 17,20α-P (▽), E₂ (■), AD (□) and T (◆). Plasma (diluted 1/16, v/v) was incubated with either tritiated T (top graph) or radioactive AD (bottom graph) and a range of concentrations of unlabelled steroids overnight at 4°C.

DISCUSSION

Our results show clear differences in the uptake of steroids by tench (regardless of sex). There also appears to be an association between the rate of uptake and the affinity of the steroids for SSBP.

There have been no previous studies on sex steroid binding in tench. However, the results that we have obtained for K_d , B_{max} , specificity of binding and rates of association and dissociation of 3H -T to tench SSBP are very similar to those obtained in goldfish (Pasmanik & Callard, 1986; Van Der Kraak & Biddiscombe, 1999) and carp *Cyprinus carpio* L. (Chang & Lee, 1992) plasma. The affinity constant in tench (3 nM) has only a marginally higher value than that found in goldfish (1.9 to 2.1 nM) and the binding capacity (170 nM) has a value that is only two-fold lower than that found in goldfish (250 to 300 nM). In comparison to K_d and B_{max} found in some other species, these differences are small. For example, K_d for 3H -T binding in the brown trout *Salmo trutta* was calculated to be 38 nM (Pottinger, 1988) and B_{max} in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* Walbaum was found to be between 2 to 8 μM (Fostier & Breton, 1975). One factor which has to be taken into account is that, in some species the amounts of SSBP can vary during the year. Although in carp (Chang & Chen, 1991) and goldfish (Pasmanik and Callard, 1986), SSBP concentrations remain relatively constant throughout the reproductive cycle and were very similar in males and females, plasma SSBP levels in brown trout *Salmo trutta* L. (Pottinger, 1988) and rainbow trout (Foucher *et al.*, 1992) decreased during the spawning phase and returned to higher levels after spawning. The reverse situation (an increase in SSBP concentrations during the spawning phase) was noted in the spotted seatrout (Laidley & Thomas, 1997).

It was established by Pasmanik & Callard (1986) and Van Der Kraak &

Biddiscombe (1999) that the SSBP in goldfish plasma displayed a similar affinity for both $^3\text{H-T}$ and $^3\text{H-E}_2$.

Unfortunately, we were unable to obtain reliable data for $^3\text{H-E}_2$ binding and are therefore unable to state whether the tench SSBP is, as in goldfish, a 'testosterone-estradiol binding globulin'. However, in tench, the ability of unlabelled E_2 to displace $^3\text{H-T}$ from SSBP appears to be identical to that in the goldfish (Pasmanik & Callard, 1986) – indicating that the tench SSBP might also be similar to goldfish SSBP in its ability to bind E_2 .

No other fish plasma binding studies appear to have been conducted with $^3\text{H-AD}$ as a ligand. However, Van Der Kraak & Biddiscombe (1999) showed that AD was nearly as good as T in displacing $^3\text{H-E}_2$ from goldfish SSBP. This is not the case for all species. In eel *Anguilla japonica* Temminck & Schlegel, for example, AD has < 1% the potency of T in displacing $^3\text{H-T}$ from the SSBP (Chang *et al.*, 1994). In tench, the SSBP has a slightly higher affinity for $^3\text{H-AD}$ than $^3\text{H-T}$, only a slightly lower capacity and similar specificity. This suggests that both steroids bind to the same site (i.e. a single SSBP). In previous studies on tench (Pinillos *et al.*, 2003b) it has been shown that AD is often present at much higher concentrations than T in both plasma and water. It certainly appears to be a major steroid in both species and, although no hormonal role has been attributed to it, there is evidence that AD is used as a pheromone in the goldfish (Poling *et al.*, 2001).

The relatively poor ability (6%) of 11-KT, the major male androgen, to bind to SSBP has been noted in several other species (Chang & Lee, 1992; Hobby *et al.*, 2000). However, this is not the case in all fish species. In the eel (Chang *et al.*, 1994), rainbow trout (Fostier & Breton, 1975) and spotted sea trout *Cynoscion nebulosus* Cuvier (Laidley & Thomas, 1994), for example, 11-KT has 25%, 15% and 10% the potency, respectively, of T in displacing $^3\text{H-T}$ from SSBP.

The very low ability of 17,20 β -P to displace ^3H -T from SSBP (< 5%) also appears to be a feature in many other species (Chang & Lee, 1992; Laidley & Thomas, 1994; Chang *et al.*, 1994). There appears to be no separate binding protein for this steroid, despite its major role as the 'maturation-inducing hormone' in teleosts (Scott & Canario, 1987).

The total inability of 3 α ,17,21-P-5 β to displace radiolabelled AD or T from the SSBP or to be taken up from the water is not surprising. This steroid, which is abundant in the plasma of female plaice *Pleuronectes platessa* L. (Inbaraj *et al.*, 1997), has not been detected in the plasma of tench (own unpublished data). The shape of the molecule is also markedly different from that of the other steroids used in the present study – making it most unlikely to be recognised by the binding region of the SSBP.

The reason for including 17,20 α -P in the present study is that this steroid is clearly present in the plasma of male and female tench (Pinillos *et al.*, 2003a) and shows a similar response to gonadotrophin-releasing hormone as 17,20 β -P (Pinillos *et al.*, 2003b). Its function, however is unknown. The present data indicate that the rate of uptake of the two steroids is also similar. However, 17,20 α -P shows stronger binding to SSBP than 17,20 β -P.

There is little or no data in the literature with which we can match our findings on the rate of disappearance of steroids from the water. However, it was noted by Budworth & Senger (1993) that, in a closed circulation system, T that was injected into one set of fish was readily transferred to another set fish. Vermeirssen & Scott (1996) showed that ^3H -17,20 β -P was taken up rapidly from the water (75% over 5 h) from the head region of rainbow trout. This is a higher rate of uptake than that noted in the present study. However, the fish were much larger (350 g average) and the water volume lower (1 L). The ratio of specific activity of radiolabel in plasma and water varied between 10 and 20

(cf. 25 in the present study).

In broad terms, the rate of uptake of steroids matches the ability of the same steroids to bind to plasma proteins. The one difference, however, is that, while 17,20 β -P is taken up faster than 11-KT by live fish, its affinity for the SSBP appears to be much lower. Without further experimentation, one can only speculate on the reasons for this anomaly. It could be because ^3H -11-KT was the least pure of the radiolabels that were used in the study (though we consider this unlikely to cause such a large difference in uptake rates between 11-KT and 17,20 β -P) or because trans-branchial diffusion of steroids is not as passive process as believed.

What are the implications of our results for the release of steroids? For T, the propensity to bind to SSBP matches its general low rate of release into water. However, in goldfish (Scott & Sorensen, 1994) and tench (Pinillos *et al.*, 2003b), despite a high affinity for SSBP, AD appears to be released in relatively large amounts into the water. While at first sight perplexing, this situation could easily arise if AD, but not T, is synthesised in these species in amounts that exceed the binding capacity of the SSBP. The binding capacity of SSBP for AD in tench (150 nM) is equivalent to a concentration of 42 ng/ml. Average concentrations of AD in excess of 50 ng/ml have been measured in both male and female tench (Pinillos *et al.*, 2003a). The binding capacity of T (170 nM) in tench is equivalent to 48 ng/ml, while the highest average concentration measured by Pinillos *et al.* (2003a) was only 28 ng/ml.

The actual capacity of SSBP for steroids other than T or AD has not been measured. However, the low amounts of radioactivity recovered in plasma after 7 h suggest that it is not high. This means that 17,20 β -P, 17,20 α -P and 11-KT probably exceed the binding capacity at relatively low concentrations. This, coupled with their lower affinity, possibly encourages the passage of these steroids into the water at relatively

low plasma concentrations. It certainly provides a plausible explanation for why, in goldfish, concentrations of T in plasma (Moriwaki *et al.*, 1987) are ca. six times higher than those of 17,20 β -P yet, in water (Scott & Sorensen, 1996) they are ca. six times lower.

There is certainly more research needed before we can definitively link the rate of release of steroids to their ability to bind to SSBP. The relative importance of binding affinity and binding capacity in holding on to the steroids will be dependent on the plasma concentrations of the steroids and whether the fish are in a static or dynamic system. Complexity is added to the system by the fact that concentrations of SSBP can change, that some steroids are metabolised/conjugated quicker than others, that the passage of steroids will be affected by the rates of blood flow and respiration and possibly also by their hydrophobicity.

Based on HPLC analysis of water after 3 h (and after 7 h for 11-KT), there appeared to be very little degradation of steroids during the course of the experiment. Even though the 11-KT radiolabel was only 80% intact at 3 h, the fact that it had not changed after 7 h implied that it was already impure at the beginning of the experiment (suggesting that pre-purification of radiolabels would be a good idea in future experiments). Where there were other minor peaks on the HPLC, none appeared to be in expected elution positions of sulphated or glucuronidated metabolites of the respective steroids. In the rainbow trout, Vermeirssen & Scott (1996) showed that, when ^3H -17,20 β -P was injected into rainbow trout, some of the radioactivity appeared in the urine in the form of sulphated 17,20 β -P. The absence of any 17,20 β -P-sulfate in the water in the present study is unlikely to be due to urine retention by the fish but because sulfation appears to be a minor route of conjugation in tench (Pinillos *et al.*, 2003b). One of the major conjugates found in tench plasma was testosterone glucuronide (Pinillos *et al.*, 2003b) and the main route of excretion for this compound in the rainbow trout was shown

to be the bile (Vermeirssen & Scott, 1996). Since the release of bile into the gut is dependent on feeding – and then the release of that bile from the gut into the water is dependent on defecation, it is not surprising that little or no glucuronidated metabolites appeared in the water in the present study. No HPLC analysis was carried out on the radioactivity that was present in the bile. This would possibly have revealed how the steroids were removed from the circulation. Certainly, the amount of radioactivity that was recovered from the bile was related to the amount of radioactivity that had been taken up by the fish.

The rates of association and dissociation of T and AD with the tench SSBP were so rapid, less than 30 sec. that we could not get accurate estimates. Similar difficulty was encountered by Laidley and Thomas (1994) when they were characterising the SSBP of the spotted sea trout. The fact that half-time dissociation is less than 30 sec shows that the interaction between steroid and SSBP is very unstable - which has been proposed to facilitate the delivery of steroids to the target tissues. An active role for the SSBP has also been proposed in the cellular uptake and intracellular transport of steroids since high affinity receptors for SSBP are present on steroid target tissues (Strel'chyonok and Avvakumov, 1990).

Finally, as mentioned in the Introduction, the roles of SSBPs have been proposed to be 1) the protection of steroids from rapid metabolic clearance (Plymate et al. 1990) and 2) modulation of steroid availability and uptake by target tissues (Pardridge, 1981). To these, we add a third proposed role (specifically for fish) of controlling the rates of release and uptake of steroids across the gills. The importance of such a role is especially clear when the fish is using the steroid as a pheromone. What is not clear, but could be potentially important, is the role that SSBP plays in the transfer of hormonally-active steroids between fish. There are many examples in the literature of 11-KT being found in the plasma of

female fish and E₂ in the plasma of male fish (Lokman et al., 2001; Barcellos et al, 2001; Scott et al., 2001). In how many cases, one wonders, might this be simply due to fish-to-fish transfer of steroids (i.e. the release of a steroid by one sex and its reabsorption and retention, with the aid of SSBP, by the other sex)?

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by a grant from the Spanish Ministry of Culture to M.L. Pinillos. We are very grateful to Dr Tom Pottinger for advice on the characterisation of the SSBP.

REFERENCES

- Barcellos, L. J., Wassermann, G. F., Scott, A. P., Woehl, V. M., Quevedo, R. M., Ittzes, I., Krieger, M. H. & Lulhier, F. (2001). Steroid profiles in cultured female jundia, the Siluridae *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, Pisces Teleostei), during the first reproductive cycle. *General and Comparative Endocrinology* **121**, 325-32.
- Budworth, P. R. & Senger, P. L. (1993). Fish-to-fish testosterone transfer in a recirculating-water system. *The Progressive Fish-Culturist* **55**, 250-254.
- Chang, C. F. & Lee, Y. H., 1992. Purification of the sex-steroid binding protein from common carp (*Cyprinus carpio*) plasma. *Comparative Biochemistry and Physiology* **101B**, 587-590.
- Chang, C. -F. & Chen, M. -R. (1991). Lack of correlation found between plasma sex steroids and sex steroid-binding capacity during the annual cycle of the female common carp. *Bulletin of the Institute of Zoology, Academia Sinica* **30**, 81-86.
- Chang, C. -F., Lee, Y. -H., Yoshida, T. & Sun, L. -T. (1994). Characterization of the plasma sex steroid-binding protein in eel (*Anguilla japonica*). *Comparative*

- Biochemistry and Physiology* **108B**, 189-197.
- Chang, C-F. & Chen, M-R. (1990). The difference in the degree of steroid-binding activity in fishes. *Bulletin of the Institute of Zoology, Academia Sinica* **29**,41-47.
- Chang, C-F. & Lee, Y. H. (1992). Purification of the sex-steroid binding protein from common carp (*Cyprinus carpio*) plasma. *Comparative Biochemistry and Physiology* **101B**, 587-590.
- Fostier, A. & Breton, B. (1975). Binding of steroids by the plasma of a teleost: the rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Journal of Steroid Biochemistry* **6**, 345-351.
- Foucher, J. L., Le Bail, P. Y. & Le Gac, F. (1992). Influence of hypophysectomy, castration, fasting, and spermiation on SBP concentration in male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *General and Comparative Endocrinology* **85**,101-110.
- Hobby, A. C., Pankhurst, N. W. & Geraghty, D. P. (2000). A comparison of sex steroid binding protein (SBP) in four species of teleost fish. *Fish Physiology and Biochemistry* **23**, 245-256.
- Inbaraj, R. M., Scott, A. P. & Vermeirssen, E. L. M. (1997). Use of a radioimmunoassay which detects C₂₁ steroids with a 5 β -reduced, 3 α -hydroxylated configuration to identify steroid involved in final oocyte maturation in female plaice (*Pleuronectes platessa*). *General and Comparative Endocrinology* **105**, 50-61.
- Laidley, C. W. & Thomas, P. (1994). Partial characterization of a sex steroid-binding protein in the spotted sea trout (*Cynoscion nebulosus*). *Biology of Reproduction* **51**, 982-992.
- Laidley, C. W. & Thomas, P. (1997). Changes in plasma sex steroid-binding protein levels associated with ovarian recrudescence in the spotted seatrout (*Cynoscion nebulosus*). *Biology of Reproduction* **56**, 931-937.
- Lokman, P. M., Harris, B., Kusakabe, M., Kime, D. E., Schulz, R. W., Adachi, S. &

- Young, G. (2002). 11-Oxygenated androgens in female teleosts: prevalence, abundance, and life history implications. *General and Comparative Endocrinology* **129**, 1-12.
- Moriwaki, T., Kobayashi, M., Aida, K. & Hanyu, I. (1991). Changes in plasma gonadotropin and steroid hormone levels during ovulation induced by HCG treatment in female goldfish. *Nippon Suisan Gakkaishi* **57**, 41-43.
- Pardridge, W. M. (1981). Transport of protein-bound hormones into tissues *in vivo*. *Endocrine Reviews* **2**, 103-123.
- Pasmanik, M. & Callard, G. (1986). Characteristics of a testosterone-estradiol binding globulin (TEBG) in goldfish serum. *Biology of Reproduction* **35**, 838-845.
- Pinillos, M. L., Delgado, M. J. & Scott, A. P. (2003). Seasonal changes in plasma sex steroid concentrations and gonadal morphology of tench *Tinca tinca* L. *Aquaculture Research* (in press a).
- Pinillos, M. L., Guijarro A. I., Delgado, M. J., Hubbard, P. C., Canário, A.V. M. & Scott, A. P. (2003). Production, release and olfactory detection of sex steroids by the tench (*Tinca tinca*, L). *Fish Physiology and Biochemistry* (in press b).
- Plymate, S. R. Namkung, P. C., Metej, L. A. & Petra, P. H. (1990). Direct effect of plasma sex hormone binding globulin (SHBG) on the metabolic clearance rate of 17 β -estradiol in the primate. *Journal of Steroid Biochemistry* **36**, 311-317.
- Poling, K.R., Fraser, E.J., & Sorensen, P.W. (2001). The three steroidal components of the goldfish preovulatory pheromone signal evoke different behaviors in males. *Comparative Biochemistry and Physiology* **129B**, 645-651.
- Pottinger, T.G. (1988). Seasonal variation in specific plasma- and target-tissue binding of androgens, relative to plasma steroid levels, in the brown trout, *Salmo trutta* L. *General and Comparative Endocrinology* **70**, 334-344.
- Pottinger, T. G. & Pickering, A. D. (1985). The effects of 11-ketotestosterone and

- testosterone on the skin structure of brown trout, *Salmo trutta* L. *General and Comparative Endocrinology* **59**, 335-342.
- Scott, A. P. & Canario, A. V. M. (1987). Status of oocyte maturation-inducing steroids in teleosts. In *Proceedings of the 3rd International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, St. John's, Newfoundland, Canada, August, 1987* (Idler, D. R., Crim, L. W. & Walsh, J. M., eds), pp. 224-234. St. Johns, Canada: Marine Science Research Laboratory.
- Scott, A. P. & Sorensen, P. W. (1994). Time course of release of pheromonally active gonadal steroids and their conjugates by ovulatory goldfish. *General and Comparative Endocrinology* **96**, 309-323.
- Scott, A. P., Pinillos, M. & Ellis, T. (2001). Why measure steroids in fish plasma when you can measure them in water? In *"Perspectives in Comparative Endocrinology: Unity and Diversity"*: (Goos, H. J. Th., Rastogi, R. K., Vaudry, H. & Pierantoni, R. ed.s), 1291-1295. Bologna, Italy: Monduzzi Editore S.p.A.
- Scott, A.P. and Vermeirssen, E.L.M. (1994). Production of conjugated steroids by teleost gonads and their role as pheromones. In *"Perspectives in Comparative Endocrinology"* (K.G. Davey, R.E. Peter, and S.S. Tobe, eds), pp 645-654. National Research Council of Canada, Ottawa.
- Sorensen, P. W., Scott, A. P. & Kihlslinger, R. L. (2000). How common hormonal metabolites function as relatively specific pheromonal signals in the goldfish. In *Proceedings of the 6th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, Bergen, Norway, July 4-9, 1999* (Norberg, B., Kjesbu, O. S., Taranger, G. L., Andersson, E. & Stefansson, S. O., eds), pp. 125-128. Bergen, Norway: Bergen 2000.
- Stacey, N. (1991). Hormonal pheromones in fish: status and prospects. In *Proceedings of*

- the 4th International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish, Norwich, UK, 7-12 July 1991.* (Scott, A. P., Sumpter, J. P., Kime, D. E. & Rolfe, M. S., eds.), pp. 177-181. Sheffield, UK: FishSymp 91.
- Stacey, N. E., Sorensen, P. W., Dulka, J. G., Cardwell, J. R. & Irvine, A. S. (1991). Fish sex pheromones: current status and potential applications. *Bulletin of the Institute of Zoology, Academia Sinica*, Monograph **16**, 189-227.
- Steffens, W. (1995). The tench (*Tinca tinca* L.), a neglected pond fish species. *Polskie Archiwum Hydrobiologii* **42**, 161-180.
- Strel'chyonok O. A. & Avvakumov, G. V. (1990). General review: specific steroid-binding glycoproteins of human blood plasma; novel data on their structure and function. *Journal of Steroid Biochemistry* **35**, 519-534.
- Van der Kraak, G. & Biddiscombe, S. (1999). Polyunsaturated fatty acids modulate the properties of the sex steroid binding protein in goldfish. *Fish Physiology and Biochemistry* **20**, 115 - 123.
- Vermeirssen, E.L.M. & Scott, A.P. (1996). Excretion of free and conjugated steroids in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): evidence for branchial excretion of the maturation-inducing steroid, 17,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one. *General and Comparative Endocrinology* **101**, 180-194.

7. Discusión general

De forma global, los resultados presentados en esta Memoria aportan información básica en una especie de importancia piscícola, la tenca, en relación con distintos aspectos de su endocrinología reproductora. Aunque los apartados de discusión de los diferentes artículos incluyen una gran parte de las ideas y opciones que a continuación se presentan, hemos considerado interesante incluir en la presente Tesis doctoral esta sección final de discusión general en la que, en la medida de lo posible, pretendemos integrar la información obtenida en los distintos experimentos, y compararlo con la información existente en otros peces, con el fin de ofrecer un perspectiva más general de nuestras aportaciones al avance del conocimiento de la endocrinología de la reproducción en los peces.

7.1. Reproducción estacional en el ciprínido *Tinca tinca*

Es bien conocido que la tenca muestra una reproducción estacional, estando la época del desove limitada a los meses de mayo a Julio, existiendo información previa sobre la morfología gonadal en poblaciones centroeuropeas de tenca. La novedad de nuestro trabajo reside en que aportamos información básica sobre aspectos desconocidos con anterioridad, como es la concentración de los esteroides sexuales circulantes más importantes en ambos sexos, y sus modificaciones estacionales en condiciones naturales de fotoperiodo y temperatura a lo largo de un ciclo anual.

Las concentraciones plasmáticas estacionales de andrógenos medidas en los machos de tenca en el presente estudio son similares a las descritas en la mayoría de las especies de teleósteos estudiadas hasta la fecha. De forma general, se encuentran concentraciones bajas a lo largo del año, salvo un aumento muy significativo en la estación reproductora (Borg, 1994). Durante los meses de otoño e invierno, las concentraciones de los tres andrógenos medidos son bajas, coincidiendo con un estado de reposo testicular en el que únicamente se observan espermatogonias y espermatocitos primarios.

El andrógeno más relevante en muchos teleósteos, la 11-KT, no parece serlo en la tenca, aunque su presencia exclusiva en los machos nos anima a sugerir que, al igual que se ha descrito para alguna otra especie (Kobayashi *et al.*, 1991; Oliveira *et al.*, 2001), esta hormona podría ser la responsable de la adquisición de los caracteres sexuales secundarios. De hecho, la tenca presenta un notorio dimorfismo sexual (los machos presentan un arqueamiento en la aleta pélvica, que además es de mayor tamaño

debido al engrosamiento del segundo radio), diferenciándose ambos sexos incluso fuera de la época de cría.

Durante la primavera, el testículo experimenta una activa espermatogénesis, momento en el cual la concentración de andrógenos se encuentra elevada coincidiendo con bajas concentraciones de los esteroides C_{21} . Este hecho podría revelar una implicación de los andrógenos en la espermatogénesis. Datos a favor de esta hipótesis los encontramos en algunos estudios antiguos en teleósteos que indican que la supresión de la espermatogénesis causada por hipofisectomía puede ser restaurada por la administración de andrógenos. (Billard, 1986). Posteriormente se demostró que la 11-KT induce todos los estados de la espermatogénesis y estimula a las células de Sertoli en preparaciones testiculares *in vitro* de *Anguilla japonica* (Miura *et al.*, 1991b). No obstante, datos muy recientes señalan que, además de la 11-KT, se requieren otros factores en la regulación de la espermatogénesis, ya que al comparar en *A. japonica* la calidad del esperma producido tras la adición de 11-KT a cultivos de fragmentos testiculares con la del obtenido mediante administración de gonadotropinas *in vivo* se obtiene una menor calidad *in vitro* (Miura *et al.*, 2002). Estas diferencias deben interpretarse con cautela ya que las aproximaciones *in vitro* no siempre reproducen fielmente la fisiología del animal *in vivo*.

En cuanto a los niveles circulantes de los esteroides C_{21} , encontramos un incremento del progestágeno 17,20 β ,21-P en julio, coincidiendo con el desove en el hábitat natural de la tenca. Este hecho sugiere que dicho esteroide estaría regulando la espermiación en la tenca, tal y como se ha sugerido para otras especies (Yueh y Chang, 1997). Pero además, el hecho de que su concentración continúe elevada en agosto, cuando la época de puesta ha finalizado, estaría indicando que su función no se restringe al control de la espermiación y liberación del esperma. Por el momento no tenemos información adicional para proponer otras posibles funciones de este esteroide en el ciclo reproductor de la tenca.

La población de tencas de la que proceden las utilizadas en nuestro estudio desovan en los meses de verano (según nuestras observaciones). La oviposición se produce de manera intermitente, los huevos son liberados en varios lotes a lo largo de esta estación. El índice ovárico presenta su máximo en el mes de Julio, cuando la época de freza está a punto de comenzar. Al comparar los índices ováricos máximos medidos en la población de tencas del presente estudio con los publicados para poblaciones centroeuropeas de esta misma especie (Breton *et al.*, 1980), encontramos valores

inferiores en nuestro caso. Además de las diferencias medioambientales de los hábitats que ocupan estas dos poblaciones de tencas, los peces utilizados en nuestro estudio eran significativamente más pequeños que los del trabajo de Breton y colaboradores. En apoyo de esta justificación existe un estudio (Chábera, 1980) que indica una falta de correlación entre el peso del ovario y el tamaño de la tenca, teniendo los peces de menor tamaño ovarios significativamente menores que los que les correspondería. Por lo tanto, el valor del índice ovárico debe interpretarse con cautela, especialmente al comparar individuos con grandes diferencias de tamaño corporal.

En relación con la evolución anual del índice ovárico podemos afirmar que presenta una notable correlación con la evolución estacional de las reservas metabólicas en esta especie (Guijarro *et al.*, 2003). La tenca almacena reservas metabólicas (principalmente proteínas y glucógeno) durante los meses de otoño e invierno, que serán utilizadas posteriormente para asegurar el desarrollo gonadal durante la primavera. Concretamente, el hígado de las tencas hembra inicia la síntesis proteica varios meses antes de la maduración final del ovario, detectándose niveles elevados de proteínas circulantes en hembras durante el invierno (Guijarro *et al.*, 2003).

Otra diferencia a destacar entre el ciclo ovárico estacional de la población de tencas procedentes de Extremadura y el de las tencas centroeuropeas (Breton *et al.*, 1980) consiste en que tras la finalización del desove, las tencas centroeuropeas entran en un periodo de inactividad que se mantiene hasta la primavera siguiente. Sin embargo en nuestro estudio histológico del ovario se demuestra que en otoño una nueva generación de ovocitos (estados C y D) ha sido reclutada y continúa su crecimiento durante el invierno. No obstante, este fenómeno de reclutamiento no se refleja en un aumento del índice ovárico, que únicamente se produce cuando se inicia la incorporación de vitelogeninas (Tyler, 1991).

Nuestras observaciones histológicas nos permiten afirmar que, de forma similar a lo que sucede en las poblaciones de tencas centroeuropeas (Breton *et al.*, 1980), el ovario de las tencas criadas en el sur de España tiene un crecimiento asincrónico. Esta asincronía se manifiesta en que en un mismo ovario encontramos de forma simultánea ovocitos en distintos estadios de desarrollo; si bien en la tenca, y a diferencia de lo que sucede en otros peces que también tienen un desarrollo asincrónico del ovario, apenas se aprecian diferencias de tamaño entre ovocitos que están en un mismo estado de desarrollo (Emerson *et al.*, 1990). El carácter adaptativo de este mecanismo resulta inmediato, ya que al tratarse de una especie con desove intermitente, se desarrollan al

unísono los ovocitos que van a ser liberados a la vez, y sólo cuando éstos son ovulados se produce el crecimiento del siguiente lote.

En relación con los esteroides gonadales circulantes en las hembras, nuestros datos revelan concentraciones plasmáticas de estradiol similares a las encontradas en un estudio reciente realizado con tencas hembras mantenidas en primavera en condiciones ambientales naturales (Martin *et al.*, 1999), aunque significativamente superiores a las medidas en estudios anteriores (Simontacchi *et al.*, 1984). Esta diferencia bien podría deberse a la distinta metodología empleada para la cuantificación, e incluso a las distintas condiciones ambientales en las que se encontraban las tencas, ya que se ha descrito un efecto claro del fotoperiodo y la temperatura sobre la concentración plasmática de E₂ (Martin *et al.*, 1999). Está ampliamente demostrado que la función principal del E₂ es la estimulación de la producción de vitelogenina por el hígado, que será captada por el ovocito vitelogénico. Por ello nos resultó llamativo el hecho de que en primavera, estando la concentración plasmática de E₂ significativamente elevada, en las preparaciones al microscopio óptico no observamos incorporación de vitelogenina en los folículos ováricos. No obstante, el contenido de proteínas totales en el hígado de las tencas hembra en esta misma época del año es significativamente superior al de los machos (Guijarro *et al.*, 2003), confirmando también para la tenca el papel clave que desempeña el hígado como mediador del proceso vitelogénico, lo que nos permite sugerir que dicha síntesis de vitelogeninas sí está estimulada, aunque la incorporación de vitelogenina o bien se iniciaba en el momento que muestreamos o estaba a punto de comenzar. La ausencia de E₂ en Julio está justificada ya que, al menos en el grupo de hembras muestreado, la incorporación de vitelogeninas en los ovocitos en estado E había concluido (según las observaciones realizadas en el estudio morfológico del ovario), y por tanto, la producción de este esteroide estaba detenida (artículo 1). Una respuesta muy similar ocurre en *Heteropneustes fossilis* (Lamba *et al.*, 1983) y en *Oncorhynchus tshawytscha* (Slater *et al.*, 1994), donde la concentración plasmática de E₂ disminuye drásticamente de forma inmediata antes de que la maduración final del ovocito se produzca.

Los andrógenos más abundantes en el plasma de teleósteos hembras son la T y la AD (Borg, 1994; Scott y Sorensen, 1994). Ambos esteroides muestran un patrón de secreción muy similar en la tenca, si bien el incremento durante la primavera y el verano fue superior para la AD que para la T. Entre las funciones atribuidas a estos andrógenos, además del efecto estimulador sobre la síntesis de GTH-II hipofisaria, se ha sugerido

que están colaborando en la inducción de la vitelogénesis hepática, probablemente debido a su transformación en estrógenos por la aromatasa del hígado (Peyon *et al.*, 1992). La 11-KT, encontrada en el plasma de ciertas hembras de teleósteos (véase Barcélos *et al.*, 2001) no se ha detectado en la tenca.

Como indicamos en la introducción general, el esteroide 17,20 β -P es la MIH más común en la mayoría de los teleósteos estudiados. Se ha demostrado que es el esteroide que de manera más eficaz induce la maduración final del ovocito *in vitro* (Scott y Canario, 1987). Sin embargo, otro esteroide C₂₁, la 17,20 β ,21-P es igualmente efectivo induciendo la maduración en ciertas especies como *Micropogonias undulatus* (Trant y Thomas, 1988), *Salmo gairdneri* (Canario y Scott, 1988), *Limanda limanda*, *Pleuronectes platessa* (Canario y Scott, 1990) y *Halobatrachus didactylus* (Modesto y Canario, 2002). En el plasma de las tencas hembras encontramos ambos esteroides, al igual que sucede en el carpín (Scott y Sorensen, 1994) y en *Clarias batrachus* (Zairin *et al.*, 1992). Sin embargo, el patrón de secreción de dichos esteroides C₂₁ en la tenca no es el típico que cabría esperar para un esteroide inductor de la maduración. En principio, y de forma previsible, las concentraciones plasmáticas están aumentadas en julio, época en la que se produce la oviposición, pero de forma sorprendente, en agosto, cuando el desove ha finalizado y en el ovario sólo encontramos ovocitos primarios, las concentraciones plasmáticas de ambos esteroides alcanzan su valor máximo. Una situación similar se ha presentado en *Rutilus rutilus* (Lower *et al.*, 2000), en el que hembras que aún no están preparadas para el desove liberan al agua una cantidad considerable de 17,20 β -P. En un estudio reciente se ha demostrado que la administración de 17,20 β ,21-P a hembras maduras de *Micropogonias undulatus* al final del ciclo reproductor, produce una retroalimentación negativa sobre la liberación de GTH-II estimulada por GnRH, lo que evitaría la estimulación de los ovocitos que aún no están maduros (Mathews *et al.*, 2002).

A partir de estos resultados, sugerimos que el papel de estos esteroides C₂₁ en la regulación de la reproducción del ciprínido *Tinca tinca* no se restringe a la maduración final del ovocito. Serían necesarios nuevos diseños experimentales para investigar funciones adicionales de estos esteroides que muestran una presencia notable a lo largo del ciclo reproductor. Un panorama similar de desconocimiento funcional lo tenemos también con la 17,20 α -P, esteroide que comúnmente se encuentra en el plasma de teleósteos, especialmente en ciprínidos (Ebrahimi *et al.*, 1996), y cuya presencia

también se hace extensiva a la tenca (presente estudio) con un patrón estacional similar al de otros esteroides C_{21} , pero del que aún carecemos de datos sobre su posible papel biológico.

7.2. Esteroides sexuales en los peces: liberación al agua y detección mediante electro-olfatograma.

Nuestros resultados muestran claramente que el tratamiento con GnRHa u Ovaprim incrementan tanto la concentración plasmática de esteroides sexuales, como la liberación de algunos de estos esteroides al medio externo. Este efecto se observa tanto en tencas de ambos sexos, como en hembras del salmónido *Salvelinus fontinalis* y del ciprínido *Brachydanio aequipinnatus*.

En primer lugar, queremos justificar la separación de las fracciones libre, sulfatada y glucuronada para la cuantificación de los esteroides en las muestras de plasma y en los extractos de agua en el presente estudio, en base a estudios realizados en la última década en los que se destaca el papel clave que los esteroides conjugados desempeñan en el sistema feromonal de los teleósteos.

Los valores plasmáticos de andrógenos y esteroides C_{21} en sus formas libres y conjugadas, tras el tratamiento con Ovaprim o GnRHa, muestran un notorio desfase temporal en el aumento de andrógenos respecto a los esteroides C_{21} , especialmente en tencas hembras, apoyando la hipótesis planteada en otros peces de la existencia de un cambio en la esteroidogénesis gonadal (de esteroides C_{19} y C_{18} a esteroides C_{21}) en el momento de la maduración final del ovocito y la ovulación. Igualmente, la valoración de los esteroides en los extractos de agua donde se mantuvieron las hembras de *S. fontinalis* nos muestra que los andrógenos se liberaron de forma muy mayoritaria durante los días 3 y 5, mientras que en el día 9 (una vez la ovulación se había producido) no detectamos andrógenos en el agua. También en el caso de este salmónido corroboramos dicha hipótesis, la presencia de progestágenos en el agua aunque muestra un ligero aumento inicial en los primeros días tras la inyección, el mayor incremento se produce el día 7. La prevalencia en la producción de esteroides C_{21} podría deberse a cambios en la ruta biosintética que determinan que el precursor común, la 17α -P, por la acción estimuladora de las GtH-II sea transformado preferentemente en esteroides C_{21} frente a los C_{19} . En este sentido, en el momento de inducción de la maduración se ha

descrito un descenso de la actividad aromatasa en los folículos postvitelogénicos (Sakai *et al.*, 1988) y un incremento de la actividad 20 β -HSD (Tanaka, *et al.*, 2002).

Como indicamos en el apartado de introducción general, la maduración final del ovocito en los teleósteos es inducida mayoritariamente por esteroides C₂₁ (Scott y Canario 1987). Desde la histórica publicación de Idler y colaboradores, que en 1960 identificaron por primera vez la 17,20 β -P en el plasma de hembras de salmón, numerosos estudios en teleósteos la proponen como la hormona responsable de inducir la maduración final del ovocito (Jalabert, 1976; Goetz, 1983; Yamauchi *et al.*, 1984; Canario y Scott 1988; Yaron, 1995). Una posible implicación de esta hormona en la maduración del ovocito en la tenca también se ha puesto de manifiesto en un estudio previo en el que esta hormona muestra un efecto acelerador de la maduración de los folículos ováricos *in vitro*, así como una inducción de la oviposición en el 60% de las hembras tratadas con este esteroide (Epler *et al.*, 1993). Nuestro estudio estacional del ciclo reproductor de la tenca revela la existencia de 17,20 β -P y 17,20 β ,21-P en el plasma de tencas de ambos sexos. Además, el hecho de que a las 18 horas de la administración de la GnRH α , ambas formas, libre y conjugada, de la 17,20 β -P, así como la 17,20 β ,21-P libre experimenten un incremento en el plasma de tencas hembra corrobora un perfil de secreción característico de una MIH. No obstante, es necesario abordar estudios adicionales con el fin de dilucidar cuál, si no ambas, es la hormona que asume el papel principal inductor de la maduración en la tenca.

El Ovaprim indujo la ovulación en el 100% de las hembras de *Salvelinus*, por lo que este compuesto es una herramienta muy útil para inducir la ovulación en esta especie. No es el caso de *Brachydanio*, donde la eficacia induciendo la maduración se reduce al 50 %. Al comparar los efectos que la GnRH y el Ovaprim producen en la concentración circulante de ciertos esteroides, como la 17,20 α -P libre y la 17,20 β -P en sus formas libre y conjugada, observamos que, aunque ambos tratamientos resultan estimuladores a las 18 horas, el incremento fue menor en las tencas que recibieron Ovaprim. Este resultado, en principio era inesperado ya que el Ovaprim, además de la GnRH α , contiene un inhibidor dopaminérgico, habiéndose descrito que la DA ejerce una acción inhibitoria sobre la liberación de gonadotropinas (Chang y Peter 1983). De hecho, en numerosas especies de teleósteos se ha conseguido un mayor éxito en la inducción de la maduración cuando se administra conjuntamente con la GnRH un inhibidor dopaminérgico (Peter *et al.*, 1988, Silverstein *et al.*, 1999). La menor

estimulación obtenida con Ovaprim en la tenca podría obedecer a varias posibles razones. En primer lugar hay que tener en cuenta que ambos experimentos se realizaron con dos grupos de peces que, aún siendo sexualmente maduros, su tamaño corporal era diferente (800 g el grupo inyectado con GnRH frente a 200 g el inyectado con Ovaprim), y en distintos meses del año (abril frente a junio), lo que pudo condicionar la amplitud de la respuesta. Por otro lado, la dosis de GnRH que recibieron los peces a los que administramos Ovaprim fue inferior a la que recibió el grupo inyectado únicamente con el análogo de la hormona (10 µg/kg frente a 50µg/kg).

Una justificación alternativa a esta cuestión sería que, en la tenca la inhibición dopaminérgica endógena de la liberación de gonadotropinas podría estar ausente, con lo que la administración del inhibidor dopaminérgico no mejoraría la inducción farmacológica por GnRH de la maduración ovárica. Un planteamiento similar presenta Kouril (1998) a partir de resultados que complementan a los nuestros, tencas hembras inyectadas con Ovaprim pusieron una menor cantidad de huevos y de menor peso que las hembras que recibieron únicamente GnRH. En este sentido, estudios *in vivo* realizados en *Micropogonias undulatus* (Copeland y Thomas, 1989) no encontraron evidencias de que la DA inhibiera la secreción de gonadotropina. Resultados similares se han observado en *Morone saxatilis* (Holland *et al.*, 1998) y en *Pagrus major* (Kumakura *et al.*, 2003), donde la administración del antagonista dopaminérgico no incrementó la liberación de GtH estimulada por GnRH. Finalmente, añadir que el Ovaprim fue un agente muy efectivo induciendo la ovulación en hembras de *Salvelinus* (100%), pero no así en *Brachydanio* (60%) (artículo 3). Esta respuesta confirmaría, también en este ciprinido, la supuestamente débil inhibición endógena de la DA sobre la liberación de gonadotropinas.

A partir del notable efecto estimulador del Ovaprim sobre la liberación al agua del 17,20β-P en tencas hembras, y de la correlación existente entre la concentración plasmática del esteroide y su tasa de liberación, nos atrevemos a sugerir que esta hormona en la tenca puede estar actuando como feromona. Datos a favor de esta hipótesis los tenemos en el carpín, donde una investigación exhaustiva ha llevado a admitir que la 17,20β-P actúa como feromona. De forma similar a lo observado en la tenca, la inyección de gonadotropina coriónica humana induce en hembras de carpín una estimulación de la liberación de esta hormona (Scott y Sorensen, 1994). Otro argumento a favor de nuestra hipótesis es que la cantidad absoluta de este esteroide liberado al agua en el momento de máxima liberación es similar en ambas especies. Una

diferencia entre el carpín y la tenca es que, aunque las dos especies liberan al agua ambas formas glucuronada y sulfatada de la 17,20 β -P (carpín, Scott y Sorensen 1994; tenca, artículo 4), la tasa de liberación de los derivados conjugados en la tenca fue menor que la del esteroide libre. Finalmente, otro apoyo, aunque indirecto, para esta propuesta lo obtuvimos con el registro olfatográfico, en el que se pone de manifiesto que las tencas macho son capaces de detectar tanto la forma libre del esteroide 17,20 β -P como su derivado glucuronado, por lo que es necesario investigar las posibles funciones feromonales de ambos compuestos.

Otros esteroides C₂₁ son también liberados al agua por tencas hembras tras la inducción de la maduración, por ejemplo, el 17,20 α -P y el 17,20 β ,21-P, que es liberado sólo en su forma libre y transcurridas 24 horas del tratamiento hormonal. Estos esteroides se han encontrado en otras especies de ciprínidos, aunque su papel biológico se desconoce (Ebrahimi *et al.*, 1996). Así, Scott y Sorensen (1994) observaron que el 17,20 β ,21-P en el carpín, a diferencia de lo que sucede en la tenca, era liberado al agua en mayores cantidades que la propia 17,20 β -P. Otros autores consideran que la presencia de 17,20 α -P podría deberse a la acción inespecífica de deshidrogenasas (Warren *et al.*, 1993). En la actualidad, no disponemos de información adicional que nos permita ofrecer otras alternativas a la presencia de estos esteroides en el agua, por lo que es necesaria una investigación en profundidad para poder esclarecer esta cuestión.

En el plasma de las tencas inyectadas con Ovaprim observamos que a las 18 horas del tratamiento las concentraciones plasmáticas de T libre y 17,20 β -P libre son muy similares, sin embargo, la cantidad de 17,20 β -P libre liberada al agua es 6 veces mayor que la cantidad de T liberada. Esta diferencia en la dinámica de liberación de estos esteroides también se ha observado en el carpín (Scott y Sorensen, 1994). En el intento de encontrar una explicación a esta distinta tasa de liberación al agua de esteroides que se encuentran en similares concentraciones en el plasma, nos planteamos con gran interés la posibilidad de investigar el transporte de estos esteroides en el plasma, ya que un distinto grado de afinidad en su unión a las proteínas circulantes podría justificar el resultado obtenido. Esta hipótesis ha sido investigada en la presente Tesis (capítulo IV), aunque será discutida más adelante.

Una vez demostrada, por primera vez en la tenca, la relevancia del proceso de liberación al agua de los esteroides sexuales, y muy especialmente la liberación por las hembras de ciertos esteroides C₂₁ (entre los que se encuentran los candidatos a hormona

inductora de la maduración), nos resultó muy atractiva la posibilidad de poder investigar si estos esteroides podían ser detectados por los machos. Gracias a la inestimable colaboración del equipo dirigido por el Prof. Adelino Canario, en la Universidad de Algarve (Portugal) hemos podido estudiar la sensibilidad olfatoria de tencas macho a distintos esteroides que son liberados por tencas hembra tras la inducción farmacológica de la maduración del ovocito. La metodología empleada, el registro electro-olfatográfico (EOG), es una herramienta muy versátil y de enorme utilidad, que nos permite determinar la capacidad de las especies para detectar sustancias olorosas. Mediante el empleo de esta técnica es posible investigar los mecanismos que subyacen a la comunicación intra- e interespecífica en los vertebrados. Los procesos fisiológicos que desencadenan el cambio de potencial registrado en el EOG no están del todo claros. Sin embargo, se cree que es debido a la suma de los potenciales generadores de los receptores olfatorios neuronales (Scott y Scott-Johnson, 2002), de manera que la amplitud del registro, aparentemente al menos, refleja el número de neuronas que están respondiendo a una sustancia olorosa.

Los registros que presentamos en esta Memoria son los primeros publicados en la tenca. De la comparación de nuestros registros en la tenca con los EOG de otros teleósteos (Evans y Hara, 1985; Hubbard *et al.*, 2002), queremos destacar la similitud tanto en su forma como en la amplitud, salvando las diferencias de tamaño entre las distintas especies de teleósteos de las que se tienen registros.

Las tencas macho muestran una sensibilidad olfatoria máxima ante la que podría ser la MIH en las tencas hembra, la 17,20 β -P libre y su conjugado glucurónido. La sensibilidad por ambos esteroides es similar y, según los resultados obtenidos en los experimentos de adaptación cruzada, parece ser que ambas hormonas actúan a través de un mismo receptor. Estos resultados muestran ciertas diferencias con lo observado en el carpín. (Sorensen *et al.*, 1995). Mientras que en la tenca ambas formas, libre y glucuronada, de la 17,20 β -P son equipotentes estimulando el epitelio olfativo, la forma libre es 100 veces más potente que la glucuronada en el carpín. Además, la tenca fue marcadamente menos sensible al conjugado sulfatado del 17,20 β -P que el carpín (Sorensen *et al.*, 1995). Estos resultados nos animan a plantear que en la comunicación feromonal entre peces, la especificidad de especie se podría lograr no sólo a través de distintas moléculas feromonales, sino también mediante una distinta proporción de éstas y sus metabolitos. Esta doble posibilidad, en la que se combinan el tipo y las cantidades

de feromonas confiere la especificidad de especie necesaria para sincronizar ambos sexos de una misma especie en el hábitat acuático, donde existe un verdadero “caldo” de hormonas procedentes de varias especies distintas.

Para confirmar esta hipótesis sería necesario realizar estudios de liberación al agua y detección de esteroides en especies de peces que habitualmente comparten hábitat con la tenca y realizan el desove en circunstancias similares y en una misma época del año. La tenca, cuya distribución se extiende prácticamente por toda la Península Ibérica, prefiere aguas de curso lento o estancadas, con fondos limosos, donde cohabita con otras especies como carpas, barbos y percas (Doadrio, 2001). Además, estas especies frezan en épocas del año muy similares a la tenca (mayo-julio), por lo que un sistema de comunicación intraespecífico adquiere un especial interés. Desafortunadamente no existen en la bibliografía datos acerca de la liberación de esteroides sexuales en el momento de la freza ni de la sensibilidad olfatoria a los mismos en estas otras especies, salvo los referidos al carpín. Nuestros resultados obtenidos en *Salvelinus* también siguen el modelo del carpín, aunque en el agua detectamos la presencia tanto de la forma libre como de los derivados conjugados de 17,20 β -P, el derivado sulfatado aparece en mayor cantidad (artículo 3). Además, en esta especie, grandes cantidades de un metabolito reducido de la 17,20 β -P, el 17,20 α -P-5 β son liberadas al agua. La posible función de este esteroide no se conoce en la actualidad, tal vez podría estar implicado en el proceso de maduración del ovocito o bien tratarse simplemente de una forma de inactivación de la 17,20 β -P (Canario y Scott, 1990).

El sistema olfativo de las tencas machos ha resultado ser altamente sensible a las prostaglandinas (PG). La prostaglandina F_{2 α} y su metabolito 15-keto-PGF_{2 α} , actúan en el carpín como feromonas que atraen el macho hacia la hembra en el momento en que ésta se encuentra receptiva (Sorensen y Goetz 1993; Sorensen y Stacey, 1999). La liberación de una señal feromonal postovulatoria adquiere una importancia crucial para el éxito reproductor teniendo en cuenta que una vez que se produce la ovulación, los huevos únicamente son viables por un tiempo limitado, que generalmente no excede de unas pocas horas. Varios estudios han demostrado en el carpín que, tras la ovulación se liberan las prostaglandinas anteriormente mencionadas, que podrían asumir esta función de feromonas postovulatorias. Aunque nuestros datos son aún muy limitados, y podría considerarse especulativo, el hecho de que la tenca muestre una notable sensibilidad en

la detección de estas prostaglandinas estimula a continuar investigando la función de estas moléculas en la comunicación intraespecífica en los peces.

Una reflexión final en relación con esta parte del trabajo nos lleva a plantear que, aunque nuestros resultados demuestran que las tencas hembra liberan esteroides al agua tras la inducción de la maduración, siendo algunos de ellos captados por los receptores olfatorios de los machos, aún no podemos concluir que formen parte de su sistema feromonal. Queda por demostrar si éstos esteroides son capaces de desencadenar una respuesta comportamental o fisiológica en el macho, en cuyo caso podríamos catalogarlos como verdaderas feromonas sexuales en esta especie.

7.3. Incorporación por la tenca de esteroides sexuales del agua: relación con su afinidad por las proteínas plasmáticas transportadoras de esteroides.

Nuestros resultados demuestran claramente que la tenca, independientemente de su sexo, incorpora en distinta proporción los esteroides que se encuentran en el agua. Hasta el momento actual no existen estudios similares al nuestro con los que comparar las tasas de incorporación de esteroides halladas en nuestro trabajo, aunque sí se ha descrito previamente este fenómeno de captación de esteroides del agua. Así, Budworth y Senger (1993) observaron que al inyectar T en un grupo de peces, se incrementaba la concentración plasmática de esta misma hormona en otro grupo peces que no habían sido inyectados, pero mantenidos en el mismo sistema de recirculación. Otra prueba indirecta de este proceso de captación se ha obtenido en la trucha arco iris, donde el 75% del total de la 17,20 β -P desaparecía a las 5 horas de haberla añadido al agua (Vermeirssen y Scott, 1996). En nuestro estudio la tasa de incorporación para este esteroide en la tenca fue menor, si bien esta diferencia puede deberse al distinto tamaño de los animales (muy superior en las truchas) y al significativamente menor volumen de agua empleado en el trabajo de Vermeirssen y Scott.

Un primer objetivo que nos planteamos fue caracterizar en la tenca la cinética de la unión de algunos esteroides sexuales a estas SSBP ("sexual steroid binding proteins") a través del cálculo de la constante de afinidad, K_d , la densidad, B_{max} , y otros parámetros relacionados, como las tasas de asociación y disociación y la especificidad de la unión. Las características cinéticas obtenidas para la tenca en el presente trabajo son muy similares a las descritas previamente en el carpín (Pasmanik y Callard, 1986; Van Der Kraak y Biddiscombe, 1999) y en la carpa común (Chang y Lee, 1992). Sin embargo, los valores de la K_d y la B_{max} en la tenca, siendo muy próximos a los del

carpín, están bastante alejados de los estimados para otras especies, como por ejemplo *Salmo trutta* (Pottinger, 1988) y *Oncorhynchus mykiss* (Fostier y Breton, 1975). Una posible justificación para este hecho podría estar basada en las variaciones estacionales que muestran las SSBP en ciertas especies. Los niveles plasmáticos de SSBP disminuyen durante la época de puesta, recuperando tras el desove los niveles previos en *Salmo trutta* (Pottinger, 1988) y en la trucha arco iris (Foucher *et al.*, 1992), sin embargo una situación inversa se ha descrito en *Cynoscion nebulosus*, donde estas proteínas transportadoras incrementan en el momento del desove (Laidley y Thomas, 1997). Finalmente, hay especies en las que la cantidad de SSBP permanece relativamente constante a lo largo del ciclo reproductor, siendo muy similar en hembras y en machos (Chang y Chen, 1991; Pasmanik y Callard, 1986). En el caso de la tenca no podemos especular acerca de posibles cambios estacionales, ya que los ensayos de unión se realizaron únicamente utilizando plasma de machos muestreado en primavera.

La androstenediona es un andrógeno común en el plasma de muchos teleósteos, y en el caso concreto de la tenca muestra un ciclo estacional muy pronunciado, alcanzando durante el desove concentraciones significativamente más elevadas que las de otros andrógenos (artículo 1). Además, se libera al agua en cantidades muy superiores a las de T (artículo 4). En el carpín, donde la AD también es liberada al agua, Poling y colaboradores (2001) sugieren que esta hormona sirve para inhibir el comportamiento de cortejo, probablemente manteniendo bajos los niveles de gonadotropinas y el volumen de esperma en machos hasta que las hembras realicen el desove, favoreciendo de este modo la sincronización de ambos sexos. En el caso de la tenca resulta muy cuestionable un papel similar, ya que el epitelio olfatorio de los machos es insensible a este esteroide (artículo 5).

En la bibliografía consultada no hemos encontrado ningún estudio en peces en el que se analice la unión de la AD por las SSBP plasmáticas. Sin embargo, este esteroide se ha empleado en ensayos de desplazamiento, habiéndose obtenido resultados muy variables. Mientras que la AD muestra en el carpín prácticamente la misma capacidad que la T para desplazar al estradiol de su unión a las SSBP (Van Der Kraak y Biddiscombe, 1999), en *Anguilla japonica* su potencia es menor del 1% de la mostrada por la T (Chang *et al.*, 1994). En la tenca, las SSBP tienen una afinidad ligeramente mayor por AD que por T, una capacidad de unión sólo ligeramente inferior y una especificidad muy similar para ambos andrógenos. Estos resultados sugieren que ambos esteroides androgénicos pueden compartir un mismo sitio de unión en las SSBP, es

decir ser transportados por la misma proteína. Con estos datos, y teniendo presente la elevada concentración plasmática de AD en la tenca, y su liberación al agua (superior a la de la propia T), resulta evidente la importancia de la AD en la reproducción de este ciprínido. Hasta el momento actual no se le ha atribuido una función endocrina precisa a la AD, salvo en el carpín, donde se ha propuesto su implicación como feromona (Poling *et al.*, 2001).

La 17,20 β -P en la tenca tiene una capacidad muy limitada (<5%) para desplazar a la T de su unión a las proteínas plasmáticas. Este resultado parece ser general en todos los teleósteos estudiados (Chang y Lee, 1992; Laidley y Thomas, 1994; Chang *et al.*, 1994), y a pesar del papel clave que esta hormona desempeña como inductora de la maduración en muchas especies, no parece existir una proteína específica para transportar este esteroide.

Como hemos demostrado en la presente Memoria, la 17,20 α -P en la tenca muestra un perfil estacional similar al de otros esteroides C₂₁ (artículo 1), además su respuesta de liberación al agua tras la inducción con GnRH es paralela a la de la 17,20 β -P (artículo 4). Por último, podemos afirmar que la tenca capta ambos esteroides del agua en la misma proporción, aunque la unión de la 17,20 α -P es mucho más fuerte que la de la 17,20 β -P (artículo 6). A pesar de toda esta información, aún no tenemos pruebas suficientes para plantear posibles funciones de este esteroide.

En términos generales, a la vista de nuestros resultados en la tenca, sugerimos que la tasa de incorporación de esteroides del agua está directamente relacionada con la capacidad de éstos para unirse a las proteínas plasmáticas. Sin embargo hay un resultado en desacuerdo con esta afirmación. Mientras que la 17,20 β -P es captada por la tenca en mayor cantidad que la 11-KT, su afinidad por las SSBP parece ser menor. No tenemos explicación para este resultado, por lo que es necesario realizar más estudios dirigidos a confirmar esta discrepancia. Una posible idea, por el momento sin pruebas para fundamentarla, podría ser que la difusión de los esteroides a través de las branquias no se trate simplemente de un proceso pasivo como se creía, sino que existan mecanismos selectivos que determinen una dinámica distinta para ciertos esteroides concretos a través de las laminillas branquiales.

Si como habíamos asumido al diseñar el presente experimento el transporte a través de las branquias tiene lugar por simple difusión pasiva, tanto la tasa de liberación como la de captación vendrían condicionadas por la afinidad de las SSBP por los

esteroides. En el caso de la T en la tenca se da una relación directa entre una alta afinidad de unión del esteroide a las proteínas y una baja tasa de liberación. Sin embargo, no sucede así con la AD que, a pesar de mostrar una alta afinidad por las SSBP, es liberada en grandes cantidades tras la inducción farmacológica de la maduración (artículo 4). Una situación similar se ha descrito en el carpín (Scott y Sorensen, 1994). Aunque en principio esta realidad nos produce cierta perplejidad, una posible justificación la encontramos teniendo en cuenta la capacidad máxima de unión de las proteínas circulantes. En la tenca, muy probablemente la cantidad sintetizada de AD excede a la capacidad de unión de las SSBP, mientras que esto no sucede con la T. La capacidad de unión de AD de las SSBP en la tenca es 150 nM (lo que equivale a una concentración plasmática de 42 ng/ml). Nuestras determinaciones por RIA de las concentraciones de AD en la tenca, en promedio, exceden de 50 ng/ml (artículo 1). Por el contrario, la capacidad de unión de T en la tenca es 170 nM, equivalente a 48 ng/ml, y los valores máximos medidos en la presente Tesis fueron sólo de 28 ng/ml. Por tanto, la concentración de AD en el plasma superaría la capacidad máxima de unión de las proteínas circulantes, por lo que se ve favorecida la liberación al agua de este esteroide, mientras que los reducidos niveles circulantes de T quedarían lejos de la saturación de las SSBP.

La escasa radiactividad recuperada en el plasma de la tenca, tras 7 h, sugiere que, aunque no hallamos medido la capacidad máxima de unión para otros esteroides, ésta no debería ser muy alta. Lo que significa que concentraciones bajas de 17,20 β -P, 17,20 α -P y 11-KT probablemente excedan la capacidad máxima de unión de las proteínas que, junto con una afinidad inferior de estos esteroides respecto a la de AD y T, facilitaría su liberación al medio externo. Esta es posiblemente la explicación por la que la 17,20 β -P se libera en mayor cantidad que la T en la tenca, a pesar de estar ambas en concentraciones similares en el plasma de la tenca.

Las tasas de asociación y disociación de la T y AD a las SSBP del plasma de la tenca fueron tan rápidas (menos de 30 segundos), que nos fue imposible estimar los tiempos con exactitud. La misma dificultad la encuentran Laidley y Thomas (1994) al caracterizar la SSBP en *Cynoscion nebulosus*. Tasas tan rápidas de disociación nos están indicando que la interacción entre el esteroide y las proteínas es muy inestable, lo que facilitaría la liberación del esteroide a nivel de los tejidos diana.

En resumen, aunque la hipótesis resulta muy atractiva, y numerosos indicios la apoyan, aún no tenemos toda la información necesaria para definitivamente demostrar la dependencia de la liberación de esteroides al agua de su capacidad para unirse a proteínas circulantes. Hemos discutido la importancia relativa de la afinidad y la capacidad máxima de unión de las proteínas en función de la concentración plasmática de los esteroides, pero también habría que considerar si los peces se encuentran en un sistema estático o en uno dinámico. Finalmente, la complejidad es aún mayor si tenemos presente otros elementos, como posibles cambios fisiológicos en las concentraciones de las SSBP, distintas velocidades de metabolización o biotransformación de los esteroides, su diferente grado de hidrofobicidad, o incluso el efecto del flujo sanguíneo y la tasa respiratoria sobre el paso de los esteroides.

De los análisis llevados a cabo en el HPLC se deduce que hay muy poca degradación de los esteroides en el transcurso del experimento. Aunque se detectaron pequeños picos en el HPLC, ninguno de ellos aparecía en los tiempos de elución correspondientes a los derivados glucuronados o sulfatados de los respectivos esteroides. Vermeirssen y Scott (1996) inyectaron 17,20 β -P tritiada a trucha arco iris y comprobaron que parte de la radiactividad aparecía en la orina en la forma sulfatada del esteroide. El hecho de que no encontráramos derivados sulfatados en el agua de las tencas se debe a que, como hemos podido comprobar con anterioridad, la sulfatación parece ser una ruta minoritaria de conjugación de esteroides en la tenca. En cambio una vía importante es la glucuronación, como se aprecia en varios de los resultados incluidos en la presente Memoria, siendo la vesícula biliar la principal ruta de excreción de este compuesto (Vermeirssen y Scott, 1996). Trabajos recientes en la trucha arcoiris demuestran que la vesícula biliar contiene actividad feromonal, aunque la estructura química de la feromona aún está por identificar (Vermeirssen y Scott, 2001). Teniendo en cuenta que nuestras tencas no recibían alimentación durante el experimento, no resulta extraño que no halláramos derivados glucurónidos en el agua, ya que la liberación de los jugos biliares al tracto digestivo depende de la alimentación, y su excreción se realiza a través de las heces. Desafortunadamente no se analizaron los esteroides en la vesícula biliar de la tenca, aunque tenemos indicios que apoyan la presencia de dichos esteroides en la vesícula biliar, ya que la proporción de radiactividad recogida en la vesícula guarda una estrecha relación con la cantidad de radiactividad que desaparece del agua.

Clásicamente, y según se ha propuesto en la literatura, las funciones básicas de las SSBP serían proteger a los esteroides de una rápida degradación metabólica (Plymate *et al.*, 1990), y modular la disponibilidad e incorporación de los esteroides por los tejidos diana (Pardridge, 1981; Strel'chyonok y Avvakumov, 1990). A la vista de nuestros resultados proponemos una función adicional, que sería específica de peces, la de controlar las tasas de liberación e incorporación de esteroides a través de las branquias. La relevancia de esta función resulta especialmente evidente cuando el esteroide está actuando como una feromona.

8. Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos en los distintos trabajos que constituyen la presente Tesis doctoral concluimos:

- El crecimiento ovárico en la tenca es de tipo asincrónico y el desove se produce de manera intermitente. Las hembras de tenca muestran un claro perfil endocrino estacional, tanto para estrógenos, andrógenos (T y AD) y progestágenos. Nuestros resultados apoyan un papel del estradiol en el proceso vitelogénico en la tenca. En el caso de los esteroides C_{21} , $17,20\beta$ -P y el $17,20,\beta,21$ -P, con concentraciones elevadas después del desove, sugerimos que, además de su papel en la inducción de la maduración final del folículo ovárico pueden estar actuando como feromonas.
- El patrón estacional espermatogénico y de producción de andrógenos en la tenca se corresponde con los ciclos descritos para la mayoría de los teleósteos. La estrecha correlación entre espermatogénesis y andrógenos nos lleva a proponer una implicación funcional de estas hormonas en el desarrollo estacional testicular. Los esteroides C_{21} ($17,20\beta$ -P y el $17,20,\beta,21$ -P) estarían regulando la espermiación, sin poder descartar otras posibles acciones para estas hormonas.
- El tratamiento con GnRH estimula tanto la concentración plasmática de esteroides sexuales como la liberación de éstos al medio externo en dos especies de ciprínidos (*Tinca tinca*, y *Brachydanio aequipinnatus*) y un salmónido (*Salvelinus fontinalis*). En estas especies se produce el cambio en la esteroidogénesis gonadal (de esteroides C_{18} y C_{19} a C_{21}) que caracteriza la maduración final del ovocito, de forma general en los teleósteos.
- Los registros electro-olfatográficos, realizados por primera vez en la tenca, muestran perfiles de forma y amplitud similares a los observados en otros teleósteos. La tenca muestra una elevada sensibilidad olfatoria frente a ciertos esteroides sexuales y prostaglandinas, siendo máxima ante la que podría ser la MIH en las hembras, la $17,20\beta$ -P libre y su congojado glucurónido, que estarían

actuando, aparentemente, a través de un mismo tipo de receptor en el epitelio olfativo.

- La androstenediona es un andrógeno de gran relevancia en la tenca, muestra pronunciadas variaciones estacionales, con concentraciones durante el desove significativamente superiores a las de otros andrógenos. Se libera al agua en cantidades más elevada que la propia T, sin embargo el epitelio olfativo de la tenca no es sensible a este esteroide. De los estudios cinéticos de la unión a las SSBP concluimos que ambos (T y AD) son transportados por una misma proteína plasmática con elevada capacidad de unión.
- En términos generales sugerimos que la dinámica de intercambio de esteroides sexuales entre la sangre y el medio externo viene determinada en gran medida por las distintas afinidades y capacidades de las proteínas plasmáticas que los transportan. Por tanto, proponemos que, a las funciones clásicas atribuidas a las SSBP, se añada una función específica para los peces, y de gran relevancia cuando el esteroide actúa como feromona, la de regular la dinámica de liberación e incorporación de esteroides a través de las branquias.



9. Bibliografía

- Adachi, S., Kajicura, H., Kagawa, H. & Nagahama, Y. (1990). Identification of aromatizable androgens secreted by isolated thecal cell layers from vitelogenic ovarian follicles of a teleost, amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*). *Biomedical Research* 11, 359-363.
- Arukwe, A. & Goksoyr, A. (2003). Eggshell and egg yolk proteins in fish: hepatic proteins for the next generation: oogenetic, population, and evolutionary implications of endocrine disruption. *Comparative Hepatology* 2, 4-25.
- Barcellos, L.J.G., Wassermann, G.F., Scott, A.P., Woehl, V.M., Quevedo, R.M., Ittzes, I., Krieger, M.H. & Lulhier, F. (2001). Steroid profiles in cultured female jundia, the siluridae *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, Pisces Teleostei) during the first reproductive cycle. *General and Comparative Endocrinology* 121, 325-332.
- Basu, D. & Bhattacharya, S. (2002). Purification of two types of gonadotropin receptors from carp ovarian follicles: overlapping recognition by two different ligands. *General and Comparative Endocrinology* 129, 152-162.
- Becker, D., Galili, N. & Degani, G. (1992). GCMS-identified steroids and steroid glucuronides in gonads and holding water of *Trichogaster trichopterus* (Anabantidae, Pallas 1770). *Comparative Biochemistry Physiology* 103B, 15-19.
- Berndtson, A.K. & Goetz, F.W. (1987). Proteolytic enzymes in the follicular wall of brook trout and goldfish during meiotic maturation and ovulation. En "Proceedings of the 3rd International Symposium on Reproductive Physiology of Fish" pp. 248. (Idler, D.R., Crim, L.W. & Walsh, J.M., eds.) St. John's, Newfoundland, Canada: Marine Science Research Laboratory.
- Berndtson, A.K., Goetz, F.W. & Duman, P. (1989). In vitro ovulation, prostaglandin synthesis, and proteolysis in isolated ovarian follicles of the yellow perch, *Perca flavescens*: effect of 17 α ,20 β -Dihydroxy-4-pregnen-3-one phorbol ester. *General and Comparative Endocrinology* 75, 454-465.
- Billard, R. (1986). Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. *Reproduction Nutrition Development* 26, 877-920.
- Billard, R., Fostier A., Weil C., & Breton, B. (1982). Endocrine control of spermatogenesis in teleost fish. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science* 39, 65-79.
- Borg, B. (1994). Androgens in teleost fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology* 109C, 219-245.

- Breton, B., Horoszewicz, L., Bieniarz, K. & Epler, P. (1980). Temperature and reproduction in tench: effect of a rise in the annual temperature regime on gonadotropin level, gametogenesis and spawning. 1. The female. *Reproduction Nutrition Development* 20, 1011-1024.
- Bromage, N.R. & Cumaranatunga, P.R.T. (1988). Egg production in rainbow trout. En "*Recent Advances in Aquaculture*" pp. 65-138. (Muir, J.F. & Roberts R.J., eds.) Croom Helm, London & Sydney.
- Budworth, P.R. & Senger, P.L. (1993). Fish-to-fish testosterone transfer in a recirculating-water system. *The Progressive Fish-Culturist* 55, 250-254.
- Callard, G.V. (1991). Spermatogenesis. En "*Vertebrate Endocrinology: Fundamentals and Biochemicals implications*" Vol 4A, pp. 303-341. (Pang, P.K.T. & Schreibman, M.P., eds.) Academic press, New York.
- Canario, A.V.M. & Scott, A.P. (1988). Structure-activity relationships of C21 steroids in an *in vitro* oocyte maturation bioassay in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *General and Comparative Endocrinology* 71, 338-348.
- Canario, A.V.M. & Scott, A.P. (1989). Synthesis of 20 α -hydroxylated steroids by ovaries of the dab (*Limanda limanda*). *General and Comparative Endocrinology* 76, 147-158.
- Canario, A.V.M. & Scott, A.P. (1990). Effects of steroids and human chorionic gonadotropin on *in vitro* oocyte final maturation in two marine flatfish: The dab, *Limanda limanda* and the plaice, *Pleuronectes platessa*. *General and Comparative Endocrinology* 77, 161-176.
- Carrillo, M., Bromage, N.R., Zanuy, S., Prat, F. & Serrano, R. (1989). The effects of modifications of photoperiod on spawning time, ovarian development and egg quality in the sea bass. *Aquaculture* 8, 351-365.
- Cavaco, J.E., Bogerd, J., Goos, H. & Schulz, R.W. (2001). Testosterone inhibits 11-ketotestosterone-induced spermatogenesis in African catfish (*Clarias gariepinus*). *Biology of Reproduction*. 65, 1807-1812.
- Colombo, L., Belvedere, P.C., Marconato, A. & Bentivegna, F. (1982). Pheromons in teleost fish. En "*Reproductive Physiology of Fish*" pp. 84-98. (C.J.J. Richter & H.T.Th. Goos, Compilers) Pudoc, Wageningen.

- Copeland, P.A. & Thomas, P. (1989). Control of gonadotropin release in the Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*): evidence for lack of dopaminergic inhibition. *General and Comparative Endocrinology* 74, 474-483.
- Chábera, V. (1980). Analysis of artificial spawning of tench (*Tinca tinca*)- fertility of females. Diplomova prace pp. 83. VSZ C. Budejovice.
- Chan, S.L., Tan, C.H., Pang, M.K. & Lam, T.J. (1991). Vitellogenin purification and development of an assay for vitellogenin receptor in oocyte membranes of the tilapia (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus 1766). *Journal of Experimental Zoology* 57, 96-109.
- Chang, C.F. & Chen, M.R. (1991). Lack of correlation found between plasma sex steroids and sex steroid-binding capacity during the annual cycle of the female common carp. *Bulletin of the Institute of Zoology, Academia Sinica* 30, 81-86.
- Chang, C.F. & Lee Y.H. (1992). Purification of the sex-binding protein from common carp (*Cyprinus carpio*) plasma. *Comparative Biochemistry and Physiology* 101B, 587-590.
- Chang, C.F., Lee, Y.H., Yoshida, T. & Sun, L.T. (1994). Characterization of the plasma sex steroid-binding protein in eel (*Anguilla japonica*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 108B, 189-197.
- Chang, J.P. & Peter, R.E. (1983). Effects of dopamine on gonadotropin release in female goldfish, *Carassius auratus*. *Neuroendocrinology* 36, 351-357.
- Chang, J.P., Yu, K.L., Wong, A.O.L. & Peter, R.E. (1990). Differential action of dopamine receptors subtypes on gonadotropin and growth hormone release in vitro in goldfish. *Neuroendocrinology* 51, 664-674.
- Defraipont, M. & Sorensen, P.W. (1993). Exposure to the pheromone 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one enhances the behavioural spawning success, sperm production and sperm motility of male goldfish. *Animal Behaviour* 46, 245-256.
- Doadrio I. (editor) (2001). Atlas y libro rojo de los peces continentales de España. pp 213-216 Ministerio de medio Ambiente y CSIC, Madrid.
- Dulka, J.G., Stacey, N.E., Sorensen, P.W. & Van Der Kraak, G.J. (1987). A steroid sex pheromone synchronizes male-female spawning readiness in goldfish. *Nature* 325, 251-253.

- Dulka, J.G., Sloley, B.D., Stacey, N.E. & Peter, R.E. (1992). A reduction in pituitary dopamine turnover is associated with sex pheromone-induced gonadotropin secretion in male goldfish. *General and Comparative Endocrinology* 86, 496-505.
- Ebrahimi, M., Scott, A.P. & Kime, D.E. (1996). Extragonadal production of 17,20-dihydroxy-4-pregnen-3-ones in teleost fish. *General and Comparative Endocrinology* 104, 296-303.
- Emerson, L.S., Greer Walker, M. & Witthames P. R. (1990). A stereological method for estimating fish fecundity. *Journal of Fish Biology* 36, 721-730.
- Epler, P., Bierniarz, K. & Horoszewicz, L. (1981). Effect of different thermal regimes on reproductive cycles of tench *Tinca tinca* (L.) Part III. Histological characteristics of ovaries. *Polskie Archiwum Hydrobiologii* 28, 197-205.
- Epler, P., Mejza, T., Bierniarz, K. & Sokolowska, M. (1993). The effect of 17 α hydroxy 20 β dihydroprogesterone (17 α 20 β P) on carp and tench oocyte maturation *in vitro* and *in vivo*. *Polskie Archiwum Hydrobiologii* 40, 197-207.
- Evans, R.E., & Hara, T.J. (1985). The characteristics of the electro-olfactogram: its loss and recovery following olfactory nerve section in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Brain Research* 330, 65-75.
- Fostier, A. & Breton, B. (1975). Binding of steroids by the plasma of a teleost: the rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Journal of Steroid Biochemistry* 6, 345-351.
- Fostier, A., Jalabert, B., Billard, R., Breton, B. & Zohar, Y. (1983). The gonadal steroids. En "*Fish Physiology*" Vol. IXA, pp. 277-372. (Hoar, W.S., Randall, D.J., & Donaldson, E.M., eds.) Academic Press, New York.
- Foucher, J.L., Le Bail, P.Y. & Le Gac, F. (1992). Influence of hypophysectomy, castration, fasting, and spermiation on SBP concentration in male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *General and Comparative Endocrinology* 85, 101-110.
- Goetz, F.W. (1983). Hormonal control of oocyte final maturation and ovulation in fishes. En "*Fish Physiology*" Vol. IXA, pp. 117-170. (Hoar, W.S., Randall, D.J. & Donaldson, E.M., eds.) Academic Press, New York.
- Goetz, F.W., Ranjan, M., Berndtson, A.K., & Duman, P. (1987). The mechanisms and hormonal regulation of ovulation: the role of prostaglandins in teleost ovulation. En "*Proceedings of the 3rd International Symposium on Reproductive Physiology of Fish*" pp. 235-238. (Idler, D.R., Crim, L.W. & Walsh, J.M., eds.).

- Grier, H.J. (1993). Comparative organization of Sertoli cells modulating the Sertoli cell Barrier. En "Sertoli Cell" pp.703-739 (Russell, L.D. & Griswald, M.P., eds.).
- Grier, H.J., Linton, J.R., Leatherland, J.F. & Vlaming, V.L. (1980). Structural evidence for two different testicular types in teleost fishes. *The American Journal of Anatomy* 159, 331-345.
- Guijarro, A.I., Lopez-Patiño, M., Pinillos, M.L., Isorna, E., De Pedro, N., Alonso-Gómez, A.L., Alonso-Bedate, M. & Delgado, M.J. (2003). Seasonal changes in haematology and metabolic resources in the tench. *Journal of Fish Biology* 62, In press@.
- Habibi, H.R., Peter, R.E., Sokolowska, M., Rivier, J.E. & Vale, W.W. (1987). Characterization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) binding to pituitary receptors in goldfish (*Carassius auratus*). *Biology of Reproduction* 36, 844-853.
- Habibi, H.R., Marchant, T.A., Nahorniak, C.S., Van der Loo, H., Peter, R.E., Rivier, J.E. & Vale, W.W. (1989). Functional relationship between receptor binding and biological activity for analogs of mammalian and salmon gonadotropin-releasing hormones in the pituitary of goldfish. *Biology of Reproduction* 40, 1152-1161.
- Hamazaki, T.S., Nagahama, Y., Iuchi, I. & Yamagami, K. (1989). A glycoprotein from the liver constitutes the inner layer of the egg envelope (zona pellucida interna) of the fish, *Oryzias latipes*. *Developmental Biology* 133,101-110.
- Hara, T.J. (1994). The diversity of chemical stimulation in fish olfaction and gustation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 4, 1-35.
- Hobby, A.C., Pankhurst, N.W. & Geraghty, D.P. (2000). A comparison of sex steroid binding protein (SBP) in four species of teleost fish. *Fish Physiology and Biochemistry* 23, 245-256.
- Holland, M.C.H., Hassin, S. & Zohar, Y. (1998). Effects of long-term testosterone, gonadotropin-releasing hormone agonist, and pimozide treatments on gonadotropin II levels and ovarian development in juvenile female striped bass (*Morone saxatilis*). *Biology of Reproduction* 59, 1153-1162.
- Hontela, A. & Peter, R.E. (1978). Daily cycles in serum gonadotropin levels in the goldfish: effects of photoperiod, temperature, and sexual condition. *Canadian Journal of Zoology* 56, 2430-2442.

- Hontela, A. & Peter, R.E. (1983). Entrainment of daily serum gonadotropin cycles in the goldfish to photoperiod, feeding and thermocycles. *Journal of Experimental Zoology* 228, 129-134.
- Hubbard, P.C., Barata, E.N. & Canário, A.V.M. (2002). Possible disruption of pheromonal communication by humic acid in the goldfish, *Carassius auratus*. *Aquatic Toxicology* 60, 169-183.
- Idler, D.R., Fagerlund, U.H.M. & Ronald, A.P. (1960). Isolation of pregnen-4-one 17,20-diol-3-one from the plasma of Pacific salmon. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2, 133-137.
- Inbaraj, R.M., Scott, A.P. & Vermeirssen, E.L.M. (1997). Use of a radioimmunoassay which detects C₂₁ steroids with a 5 β -reduced, 3 α -hydroxylated configuration to identify steroid involved in final oocyte maturation in female plaice (*Pleuronectes platessa*). *General and Comparative Endocrinology* 105, 50-61.
- Inaba, K., Morisawa, S. & Morisawa, M. (1998). Proteasomes regulate the motility of salmonid fish sperm through modulation of cAMP-dependent phosphorylation of an outer arm dynein light chain. *Journal of Cell Science* 11, 1105-1115.
- Jalabert, B. (1976). In vitro oocyte maturation and ovulation in rainbow trout (*Salmo gairdneri*), northern pike (*Esox lucius*) and goldfish (*Carassius auratus*). *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 33, 974-988.
- Kagawa, H., Young, G. & Nagahama, Y. (1983). Relationship between seasonal plasma estradiol-17 β and testosterone levels and *in vitro* production by ovarian follicles of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*). *Biology of Reproduction* 29, 301-309.
- Kah, O., Anglade, I., Lepretre, E., Dubourg, P. & Monbrison, D. (1993). The reproductive brain in fish. *Fish Physiology and Biochemistry* 11, 85-98.
- Kanamori, A., Adachi, S. & Nagahama, Y. (1988). Developmental changes in steroidogenic responses of ovarian follicles of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*) to chum salmon gonadotropin during oogenesis. *General and Comparative Endocrinology* 72, 13-24.
- Karlson, P. & Lüscher, M. (1959). "Pheromones": a new term for a class of biologically active substances. *Nature* 183, 55-56.
- Kawauchi, H., Suzuki, K., Itoh, H., Swanson, P., Naito, N., Nagahama, Y., Nozaki, M.,

- Nakai, Y. & Itoh, S. (1989). The duality of teleost gonadotropins. *Fish Physiology and Biochemistry* 7, 29-38.
- Khan, I.A. & Thomas, P. (1999). GABA exerts stimulatory and inhibitory influences on gonadotropin II secretion in the Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*). *Reproductive Neuroendocrinology* 69, 261-268.
- Kime, D.E. (1993). "Classical" and "non-classical" steroids in teleost reproduction. *Review Fish Biology Fisheries* 3, 160-180.
- Kime, D.E. & Ebrahimi, M. (1997). Synthesis of 17,20 α - and 17,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-ones, 11-ketotestosterone and their conjugates by gills of teleost fish. *Fish Physiology and Biochemistry* 17, 117-121.
- Kishimoto, T. (1988). Regulation of metaphase by a maturation-promoting factor. *Development Growth & Differentiation* 30, 105-115.
- Kitajima, K., Kuroyanagi, H., Inoue, S., Ye, J., Troy, F.A. & Inoue, Y. (1994). Discovery of a new type of sialidase kinase, which specifically hydrolyses deaminoeueminy (3-deoxy-d-glycero-d-galacto-2-o-nonulosonic acid) but not n-acylneuaminy linkages. *Journal of Biological Chemistry* 269, 21415-19.
- Kobayashi, M., Katsumi, A. & Hanyu, I. (1987). Hormone changes during ovulation and effects of steroid hormones on plasma gonadotropin levels and ovulation in goldfish. *General and Comparative Endocrinology* 67, 24-32.
- Kobayashi, M., Aida, K. & Stacey, N.E. (1991). Induction of testis development by implantation of 11-ketotestosterone in female goldfish. *Zoological Science* 8, 389-393.
- Kobayashi, M., Sohn, Y.C., Yoshiura, Y. & Aida, K. (2000). Effects of sex steroids on the mRNA levels of gonadotropin subunits in juvenile and ovariectomized goldfish *Carassius auratus*. *Fisheries Science* 66, 223-231.
- Kobayashi, W. (1985). Communications of oocyte-granulosa cells in the chum salmon ovary detected by transmission electron microscopy. *Development Growth & Differentiation* 27, 553-61.
- Kouril, J. (1998). Hormonally induced spawning of tench *Tinca tinca* (L.) females. (A review). *Polskie Archiwum Hydrobiologii* 45, 415-433.
- Kumakura, N., Okuzawa, K., Gen, K. & Kagawa, H. (2003). Effects of gonadotropin-releasing hormone agonist and dopamine antagonist on hypothalamus-pituitary-

- gonadal axis of pre-pubertal female red seabream (*Pagrus major*). *General and Comparative Endocrinology* 2003, 264-273.
- Lamba, V.J., Goswami, S.V. & Sundararaj, B.I. (1983). Circannual and circadian variations in plasma levels of steroids (cortisol, estradiol-17 β , estrone and testosterone) correlated with annual gonadal cycle in the catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *General and Comparative Endocrinology* 50, 205-225.
- Laidley, C.W. & Thomas, P. (1994). Partial characterization of a sex steroid-binding protein in the spotted sea trout (*Cynoscion nebulosus*). *Biology of Reproduction* 51, 982-992.
- Laidley, C.W. & Thomas, P. (1997). Changes in plasma sex steroid-binding protein levels associated with ovarian recrudescence in the spotted seatrout (*Cynoscion nebulosus*). *Biology of Reproduction* 56, 931-937.
- Lancaster, P.M. & Tyler, C.R. (1994). Developmental expression and modulation of the vitellogenin receptor in ovarian follicles of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Experimental Zoology* 269, 458-466.
- Landers, J.P. & Spelsberg, T.C. (1992). New concepts in steroid hormone action: transcription factors, proto-oncogenes, and the cascade model for steroid regulation of gene expression. *Critical Reviews in Eukaryotic gene expression* 2, 19-63.
- Lazier, C.B., Longeran, K. & Mommensen, T.P. (1985). Hepatic estrogen receptors and plasma estrogen-binding activity in the Atlantic salmon. *General and Comparative Endocrinology* 57, 234-245.
- Le Menn, F. & Nuñez-Rodriguez, J. (1991). Receptors mediate endocytosis of VTG in fish follicles. En "*Proceedings of the 4th International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish*" pp. 300-302. (Scott, A.P., Sumpter, J.P., Kime, D.E. & Rolfe, M.S., eds.) Sheffield.
- Liley, N.R. (1982). Chemical communication in fish. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 39, 22-35.
- Liley, N.R. & Stacey, N.E. (1983). Hormones, pheromones and reproductive behaviour in fish. En "*Fish Physiology*" Vol. IX. Reproduction pp. 1-63. (Hoar W.S., Randall D.J. & Donaldson E.M., eds.). Academic Press, New York.
- Linhart, O. & Billard, R. (1995). Biology of gametes and artificial reproduction in common

- tench, *Tinca tinca* (L.). A review. *Polskie Archiwum Hydrobiologii* 42, 37-56.
- Lofts, B., Pickford, G.E. & Atz, J.W. (1966). Effects of methyl testosterone on the testes of a hypophysectomized cyprinodont fish, *Fundulus heteroclitus*. *General and Comparative Endocrinology* 6, 74-88.
- Loir, M. (1990). Trout steroidogenic testicular cells in primary culture II. Steroidogenic activity of interstitial cells, Sertoly cells, and spermatozoa. *General and Comparative Endocrinology* 78, 388-398.
- Lokman, P.M., Harris, B., Kusakabe, M., Kime, D.E., Schulz, R.W., Adachi, S. & Young, G. (2002). 11-Oxygenated androgens in female teleosts: prevalence, abundance, and life history implications. *General and Comparative Endocrinology* 129, 1-12.
- Lower, N.J., Scott, A.P. & Moore, A. (2000). Release of sex steroids into the water by roach (*Rutilus rutilus*). En "Proceedings of the Sixth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish" pp. 198. (Norberg, B., Kjesbu, O.S., Taranger, G.L., Andersson, E. & Stefasson, S.O., eds.) Bergen.
- Maneckjee, A., Weisbart, M. & Idler, D.R. (1989). The presence of 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one receptor activity in the ovary of the brook trout, *Salvelinus fontinalis*, during terminal stages of oocyte maturation. *Fish Physiology and Biochemistry* 6, 19-38.
- Marshall, W.S., Bryson, S.E. & Idler D.R. (1993). Gonadotropin action on brook trout sperm duct epithelium: ion transport stimulation mediated by cAMP and Ca²⁺. *General and Comparative Endocrinology* 90, 232-242.
- Martin, P., Rebollar, P.G., San Juan, L.D., Illera, J.C. & Alvariño, J.M. (1999). Plasma estradiol-17 β levels and gonadosomatic index in tench (*Tinca tinca*, L.) reared in natural and controlled conditions. *Journal of Physiology and Biochemistry* 55, 309-314.
- Mathews, S., Khan, I.A. & Thomas, P. (2002). Effects of the maturation-inducing steroid on LH secretion and the GnRH system at different stages of the gonadal cycle in Atlantic croaker. *General and Comparative Endocrinology* 126, 287-297.
- Matsubara, T., Ohkubo, N., Andoh, T., Sullivan, C.V. & Hara, A. (1999). Two forms of vitellogenin, yielding two distinct lipovitellins, play different roles during oocyte maturation and early development of Barfin flounder, *Verasper moseri*, a marine teleost that spawns pelagic eggs. *Developmental Biology* 213, 18-32.

- Mayer, I., Borg, B., & Schulz, R. (1990). Seasonal changes in and effect of castration/androgen replacement on the plasma levels of five androgens in the male three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus* L. *General and Comparative Endocrinology* 79, 23-30.
- Mikolajczyk, T., Weil, C. & Breton, B. (1993). Nicotine stimulates maturational gonadotropin (GtH2) release from carp (*Cyprinus carpio* L.) pituitary cells. *Comparative Biochemistry and Physiology* 105C, 83-88.
- Miura, T., Yamauchi, K., Takahashi, H. & Nagahama, Y. (1991a). Human chorionic gonadotropin induces all stages of spermatogenesis in vitro in the male Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Developmental Biology* 146, 258-262.
- Miura, T., Yamauchi, K., Takahashi, H. & Nagahama, Y. (1991b). Hormonal induction of all stages of spermatogenesis *in vitro* in the male Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Proceedings of the Natural Academic of Science USA* 88, 5774-5778.
- Miura, T., Yamauchi, K., Takahashi, H. & Nagahama, Y. (1992). The role of hormones in the acquisition of sperm motility in salmonid fish. *Journal of Experimental Zoology* 261, 359-363.
- Miura, T., Ando, N., Miura, C. & Yamauchi, K. (2002). Comparative studies between in vivo and in vitro spermatogenesis of Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Zoological Science* 19, 321-329.
- Modesto, T. & Canario, A.V.M. (2002). $17\alpha,20\beta,21$ Trihydroxy-4-pregnen-3-one: the probable maturation-inducing hormone steroid of the Lusitanian toadfish. *Journal of Fish Biology* 60, 637-648.
- Moore, A. & Scott, A.P. (1992). $17\alpha,20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one 20-sulphate is a potent odorant in precocious male Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr which have been pre-exposed to the urine of ovulated females. *Proceedings of the Royal Society of London Series B. Biological Sciences* 249, 205-209.
- Moore, R.K., Scott, A.P. & Collins, P.M. (2000). Circulating C-21 steroids in relation to reproductive condition of a viviparous marine teleost, *Sebastes rastrelliger* (Grass Rockfish). *General and Comparative Endocrinology* 117, 268-280.

- Murphy, C.A., Stacey, N.E. & Corkum, L.D. (2001). Putative steroidal pheromones in the round goby, *Neogobius melanostomus*: olfactory and behavioural responses. *Journal of Chemical Ecology* 27, 443-470.
- Nagahama, Y. (1983). The functional morphology of teleost gonads. En "*Fish Physiology*" Vol. IXA, pp. 223-275. (Hoar, W.S., Randall, D.J. & Donaldson, E.M., eds.) Academic Press, New York.
- Nagahama, Y. (1987). $17\alpha,20\beta$ -Dihydroxy-4-pregnen-3-one: a teleost maturation-inducing hormone. *Development Growth & Differentiation* 29, 1-12.
- Nagahama, Y. (1994). Endocrine regulation of gametogenesis in fish. *International Journal of Developmental Biology* 38, 217-229.
- Nagahama, Y. (1997). $17\alpha,20\beta$ -Dihydroxy-4-pregnen-3-one, a maturation-inducing hormone in fish oocytes: Mechanisms of synthesis and action. *Steroids* 62, 190-196.
- Nagahama, Y. & Adachi, S. (1985). Identification of a maturation-inducing steroid in a teleost, the amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*). *Developmental Biology* 109, 428-435.
- Nagahama, Y., Hirose, K., Young, G., Adachi, S., Suzuki, K. & Tamaoki, B. (1983). Relative *in vitro* effectiveness of $17\alpha,20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one and other pregnene derivatives on germinal vesicle breakdown in oocytes of ayu (*Plecoglossus altivelis*), amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*), rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and goldfish (*Carassius auratus*). *General and Comparative Endocrinology* 51, 15-23.
- Nagahama, Y., Goetz, F.W. & Tan, J.D. (1986). Shift in steroidogenesis in the ovarian follicles of the goldfish (*Carassius auratus*) during gonadotropin-induced oocyte maturation. *Development Growth & Differentiation* 28, 555-561.
- Nagahama, Y., Matsuhisa, A., Iwamatsu, T., Sakai, N. & Fukada, S. (1991). A mechanism for the action of pregnant mare serum gonadotropin on aromatase activity in the ovarian follicle of the medaka (*Oryzias latipes*). *Journal of Experimental Zoology* 259, 53-58.

- Nagahama, Y., Yoshikuni, M., Yamashita, M., Sakai, N. & Tanaka, M. (1993). Molecular endocrinology of oocyte growth and maturation in fish. *Fish Physiology and Biochemistry* 11, 3-14.
- Oliveira, R.F., Carneiro, L.A., Goncalves D.M., Canario A.V.M. & Grober M.S. (2001). 11-Ketotestosterone inhibits the alternative mating tactic in sneaker males of the peacock blenny, *Salaria pavo*. *Brain, behavior and evolution* 58, 28-37.
- Oppen-Bersten, D.O., Olsen, S.O., Rong, C.J., Taranger, G.L., Swanson, P. & Walther, B.T. (1994). Plasma levels of eggshell Zr-proteins, estradiol-17 β , and gonadotropins during an annual cycle of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of Experimental Zoology* 268, 59-70.
- Ostroumov, V.A. (1997). The role of chemical signals in the regulation of fish maturation and reproductive behaviour. *Journal of Ichthyology* 37, 103-109.
- Pankhurst, N.W. & Carragher, J.F. (1991). Seasonal endocrine cycles in marine teleost. En "Reproductive Physiology of Fish" pp. 131-135. (Scott A.P., Sumpter, J.P., Kime, D.E. & Rolfe, M.S., eds.) Sheffield.
- Pardridge, W.M. (1981). Transport of protein-bound hormones into tissues *in vivo*. *Endocrine Reviews* 2, 103-123.
- Pasmanik, M. & Callard, G. (1986). Characteristics of a testosterone-estradiol binding globulin (TEBG) in goldfish serum. *Biology of Reproduction* 35, 838-845.
- Pati, D. & Habibi, H.R. (2000). Direct action on GnRH variants on goldfish oocyte meiosis and follicular steroidogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology* 160, 75-88.
- Patiño, R. (1994). Gonads. En "An Atlas of Fish Histology. Normal and Pathological Features" Segunda edición pp 129-153 (Takashima F. & Hibiya T. eds) Gustav Fischer Verlag, Stuttgart-New York.
- Patiño, R. & Thomas, P. (1990). Characterization of membrane receptor activity for 17 α , 20 β -21-trihydroxy-4-pregnen-3-one in ovaries of spotted seatrout (*Cynoscion nebulosus*). *General and Comparative Endocrinology* 78, 204-217.
- Patiño, R., Yoshizaki, G., Thomas, P. & Kagawa, H. (2001). Gonadotropin control of ovarian follicle maturation: the two stage concept and its mechanism. *Comparative Biochemistry and Physiology* 129B, 427-439.

- Pérez-Regadera, J.J. & Velasco-Gemio, R. (1995). Reproduction of tench *Tinca tinca* (L.1758) in spawning ponds. *Polskie Archiwum Hydrobiologii* 42, 57-61.
- Peter, R.E. & Yu, K.L. (1997). Neuroendocrine regulation of ovulation in fishes: basic and applied aspects. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 7, 173-197.
- Peter, R.E., Chang, J.P., Nahorniak, C.S., Omeljaniuk, R.J., Sokolowska, M., Shih, S.H. & Billard, R. (1986). Interactions of catecholamines and GnRH in regulation of gonadotropin secretion in teleost fish. *Recent Progress in Hormone Research* 42, 513-548.
- Peter, R.E., Lin, H.R. & Van Der Kraak, G. (1988). Induced ovulation and spawning of cultured freshwater fish in china: advances in application of GnRH analogues and dopamine antagonist. *Aquaculture* 74, 1-10.
- Peter, R.E., Yu, K.L., Marchant, T.A. & Roseblum, P.M. (1990). Direct neural regulation of the teleost adenohipophysis. *Journal of Experimental Zoology* 4, 84-89.
- Peter, R.E., Trudeau, V.L. & Sloley, B.D. (1991). Brain regulation of reproduction in teleost. *Bulletin of the Institute of Zoology, Academica Sinica Monograph* 16, 89-118.
- Petrino, T.R., Greeley, M.S., Selman, K., Lin, Y.W.P. & Wallace, R.A. (1989). Steroidogenesis in *Fundulus heteroclitus*. II. Production of 17α -hydroxy-20 β -dihydroprogesterone, testosterone, and 17β -estradiol by various components of the ovarian follicle. *General and Comparative Endocrinology* 76, 230-240.
- Peyon, P., Baloche, S. & Burzawa-Gerard, E. (1992). Induction of vitellogenin synthesis by 17β estradiol and testosterone in silver eel hepatocytes maintained in primary culture. En: "Abstracts, Second International Symposium on Fish Endocrinology", pp58, Saint Malo.
- Pinter, J. & Thomas, P. (1999). Induction of ovulation of mature oocytes by the maturation-inducing steroid 17,20b,21-trihydroxy-4-pregnen-3-one in the spotted seatrout. *General and Comparative Endocrinology* 115, 200-209.
- Pimpicka, E. (1990). Formation of fecundity of tench, *Tinca tinca* (L.) females in Lake Drweckie. *Acta Ichthyologica et Piscatoria* 20, 53-75.
- Pimpicka, E. & Koryzno, A. (1995). Ovary development in juvenile tench, *Tinca tinca* reared in different thermal conditions. *Polskie Archiwum Hydrobiologii* 42, 75-83.

- Plymate, S.R., Namkung, P.C., Metej, L.A. & Petra, P.H. (1990). Direct effect of plasma sex hormone binding globulin (SHBG) on the metabolic clearance rate of 17 β -estradiol in the primate. *Journal of Steroid Biochemistry* 36, 311-317.
- Poling, K.R., Fraser, E.J., & Sorensen, P.W. (2001). The three steroidal components of the goldfish preovulatory pheromone signal evoke different behaviors in males. *Comparative Biochemistry and Physiology* 129B, 645-651.
- Pottinger, T.G. (1988). Seasonal variation in specific plasma- and target-tissue binding of androgens, relative to plasma steroid levels, in the brown trout, *Salmo trutta* L. *General and Comparative Endocrinology* 70, 334-344.
- Qu  rat, B. (1994) Molecular evolution of the glycoprotein hormones in vertebrates. En "Perspectives in Comparative Endocrinology" pp. 27-35. (Davey, K.B, Peter, R.E. & Tobe, S.S., eds.) Ottawa, National Research Council of Canada.
- Rahman, M.A., Ohta, K., Yoshikuni, M., Nagahama, Y., Chuda, H. & Matsuyama, M. (2002). Characterization of ovarian membrane receptor for 17,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one, a maturation-inducing hormone in yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. *General and Comparative Endocrinology* 127, 71-79.
- Roseblum, P.M., Sorensen, P.W., Stacey, N.E. & Peter, R.E. (1991). Binding of the steroidal pheromone 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one to goldfish, *Carassius auratus*, olfactory epithelium membrane preparations. *Chemical Senses* 16, 143-154.
- Sakai, N., Iwamatsu, T., Yamauchi, K., Suzuki, N. & Nagahama, Y. (1988). Influence of follicular development on steroid production in the medaka (*Oryzias latipes*) ovarian follicle in response to exogenous substrates. *General and Comparative Endocrinology* 71, 516-523.
- Sakai, N., Ueda, H., Suzuki, N. & Nagahama, Y. (1989). Involvement of sperm in the production of 17 α , 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one in the testis of spermiating rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Biomedical Research* 10, 131-138.
- Santos, A.J.G., Furukawa, K., Kobayashi, M., Bando, K., Aida, K. & Hanyu, I. (1986). Plasma gonadotropin and steroid hormone profile during ovulation in the carp *Cyprinus carpio*. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 52, 1159-1166.

- Scott, A.P. (1987). Reproductive Endocrinology of Fish. En "*Fundamentals of Comparative Vertebrate Endocrinology*" pp. 223-256. (Chester-Jones, I., Ingleton, P.M. & Phillips, J.G., eds.) Plenum Publishing Corp, New York & London.
- Scott, A.P. & Baynes, S.M. (1982). Plasma levels of sex steroids in relation to ovulation and spermiation in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). En "*Proceedings of the International Symposium on Reproductive Physiology of Fish*" pp. 103-106. (Richter, C.J.J. & Goos, H.J.Th., eds.) Wageningen.
- Scott, A.P. & Canario, A.V.M. (1987). Status of oocyte maturation-inducing steroids in teleost. En "*Proceedings of the 3rd International Symposium on Reproductive Physiology of Fish*" pp. 224-234. (Idler, D.R., Crim, L.W. & Walsh, J.M., eds.) St. John's, Newfoundland, Canada: Marine Science Research Laboratory.
- Scott, A.P. & Sorensen, P.W. (1994). Time course of release of pheromonally active gonadal steroids and their conjugates by ovulatory goldfish. *General and Comparative Endocrinology* 96, 309-323.
- Scott, A.P., Sumpter, J.P. & Hardiman, P.A. (1983). Hormone changes during ovulation in the rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *General and Comparative Endocrinology* 49, 128-134.
- Scott, A.P., MacKenzie, D.S. & Stacey, N.E. (1984) Endocrine changes during natural spawning in the white sucker, *Catostomus commersonii*. II. Steroid hormones. *General and Comparative Endocrinology* 56, 349-359.
- Scott, A.P., Witthames, P.R., Turner, R.J. & Canario, A.V.M. (1998). Plasma concentrations of ovarian steroids in relation to oocyte maturation and ovulation in female plaice sampled at sea. *Journal of Fish Biology* 52, 128-1454.
- Scott, J.W. & Scott-Johnson, P.E. (2002). The electroolfactogram: a review of its history and uses. *Microscopy Research and Technique* 58, 152-160.
- Selman, K. & Wallace, R.A. (1986). Oogenesis in *Fundulus heteroclitus*. IV. Yolk vesicle formation. *Journal of Experimental Zoology* 239, 277-288.
- Selman, K. & Wallace, R.A. (1989). Cellular aspects of oocyte growth in teleost. *Zoological Science* 6, 211-231.
- Simontacchi, C., Ceccarelli, P., Lombardi, F. & Minervini, R. (1984) Livelli plasmatici di

- alcuni steroidi sessuali durante il ciclo riproduttivo annuale della tinca (*Tinca tinca*). *Atti della Società Italiana di Scienze Veterinarie* **38**, 137-140.
- Specker, J.L. & Sullivan, C.V. (1994). Vitellogenesis in fishes: status and perspectives. En "*Perspectives in Comparative Endocrinology*" pp. 304-315. (Davey, K.G., Peter, R.E. & Tobe, S.S., eds.) Ottawa.
- Siiteri, P.K., Murai, J.T., Hammond, G.L., Nisker, J.A., Raymoure, W.J. & Kuhn, R.W. (1982). The serum transport of steroid hormones. *Recent Progress in Hormone Research* **38**, 457-510.
- Silverstein, J.T., Bosworth, B.G. & Wolters, W.R. (1999). Evaluation of dual injection of LHRHa and the dopamine receptor antagonist pimozide in cage spawning of chanel catfish *Ictalurus punctatus*. *Journal of the World Aquaculture Society* **30**, 263-268.
- Slater, C.H., Schreck, C.B. & Swanson, P. (1994). Plasma profiles of the sex steroids and gonadotropins in maturing female spring chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Comparative Biochemistry and Physiology* **109A**, 167-175.
- Smith, R.L. (1973). The Excretory Function of Bile. Chapman and Hall, London
- Sorensen, P.W. & Goetz, F.W. (1993). Pheromonal and reproductive of F prostaglandins and their metabolites in teleost fish. *Journal of Lipid Mediators* **6**, 385-393.
- Sorensen, P.W. & Caprio, J. (1998). Chemoreception. En "*The Physiology of Fishes*" pp. 375-405. (Evans, D.H. ed.) CRC Press, Boca Ratón, Florida.
- Sorensen, P.W. & Stacey, N.E. (1999). Evolution and specialization of fish hormonal pheromones. En "*Advances in Chemical Signals in Vertebrates*" pp. 15-47. (Johnston, R.E., Muller-Schwarze, D. & Sorensen P.W., eds) Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Sorensen, P.W. & Wyatt, J. (2000). Pheromones. En "*The Corsini Encyclopedia of Psychology and Behavioral Science*". (Craighead, W.E. & Nemeroff, C.B., eds) John Wiley & Sons, New York.
- Sorensen, P.W., Hara, T.J. & Stacey, N.E. (1991). Sex pheromones selectively stimulate the medial olfactory tracts of male goldfish. *Brain Research* **558**, 343-347.
- Sorensen, P.W., Irvine, I.A., Scott, A.P. & Stacey, N.E. (1992). Electrophysiological measures of olfactory sensitivity suggest that goldfish and other fish use species-specific mixtures of hormones and their metabolites as sex pheromones. En

- "*Chemical Signal in Vertebrates*" Vol. 6, pp. 357-364. (Doty, R. & Muller-Schwarze, eds.) Plenum Press, New York.
- Sorensen, P.W., Scott, A.P., Stacey, N.E. & Bowdin, L. (1995). Sulfated 17,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one functions as a potent and specific olfactory stimulant with pheromonal actions in the goldfish. *General and Comparative Endocrinology* 100, 128-142.
- Sorensen, P.W., Scott, A.P. & Kihlslinger, R.L. (2000). How common hormonal metabolites function as relatively specific pheromonal signals in the goldfish. En "*Proceedings of the 6th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish*" pp. 125-128. (Norberg, B., Kjesbu, O.S., Taranger, G.L., Andersson, E. & Stefansson, S.O., eds.) Bergen.
- Specker, J.L. & Sullivan, C.V. (1994). Vitellogenesis in fishes: status and perspectives. En "*Perspectives in Comparative Endocrinology*" pp. 304-315. (Davey, K.B., Peter R.E. & Tobe, S.S., eds.) Ottawa: National Research council of Canada.
- Stacey, N.E. & Sorensen, P. (1991). Function and evolution of fish hormonal pheromones. En "*Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*" Vol. 1, pp. 109-135. (Hochachka, P.W. & Mommsen, T.P., eds.) Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam.
- Stacey, N.E., Peter, R.E., Cook, A.F., Truscott, B., Walsh, J.M. & Idler, D.R. (1983). Changes in plasma concentration of gonadotropin, 17 β -estradiol, testosterone, and 17 α -hydroxy,20 β -dihydroprogesterone during spontaneous and brain lesion-induced ovulation in goldfish. *Canadian Journal of Zoology* 61, 2646-2652.
- Stacey, N.E., Sorensen, P.W., Van Der Kraak, G.J. & Dulka, J.G. (1989). Direct evidence that 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one functions as a goldfish primer pheromone: Preovulatory release is closely associated with male endocrine responses. *General and Comparative Endocrinology* 75, 62-70.
- Stacey, N.E., Cardwell, J. & Murphy, C. (1996). Hormonal pheromones in freshwater fishes: Preliminary results of an electro-olfactogram survey. En "*Fish Pheromones: Origins and Modes of Action*" pp. 47-55. (Canario, A.V.M. & Power, D.M., eds.) Universidade do Algarve, Faro.
- Stacey, N.E., Fraser, E.J., Sorensen, P.W. & Van Der Kraak, G. (2001). Milt production in

- goldfish: regulation by multiple social stimuli. *Comparative Biochemistry and Physiology* 130C, 467-476.
- Steffens, W. (1995). The tench (*Tinca tinca* L.), a neglected pond fish species. *Polskie Archiwum Hydrobiologii* 42, 161-180.
- Strel'chyonok, O.A. & Avvakumov, G.V. (1990). General review: specific steroid-binding glycoproteins of human blood plasma; novel data on their structure and function. *Journal of Steroid Biochemistry* 35, 519-534.
- Simontacchi, C., Ceccarelli, P., Lombardi, F. & Minervini, R. (1984) Livelli plasmatici di alcuni steroidi sessuali durante il ciclo riproduttivo annuale della tinca (*Tinca tinca*). *Atti della Società Italiana di Scienze Veterinarie* 38, 137-140.
- Sundararaj, B., Nayyar, S.K., Anand, T.C. & Donaldson, E.M. (1971) Effects of salmon pituitary gonadotropin, ovine luteinizing hormone and testosterone on the testes and seminal vesicles of hypophysectomized catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *General and Comparative Endocrinology* 17, 73-83.
- Suzuki, K., Kawauchi, H. & Nagahama, Y. (1988). Isolation and characterization of subunits of two distinct salmon gonadotropins. *General and Comparative Endocrinology* 71, 302-306.
- Swanson, P. (1991). Salmon gonadotropins: reconciling old and new ideas. En "Reproductive Physiology of Fish" pp. 2-7. (Scott A.P., Sumpter, J.P., Kime, D.E. & Rolfe, M.S., eds.) Sheffield.
- Swanson, P., Suzuki, K., Kawauchi, H. & Dickhoff, W.W. (1991). Isolation and characterization of two coho salmon gonadotropins, GtH-I and GtH-II. *Biology of Reproduction* 44, 29-38.
- Tanaka, M., Nakajin, S., Kobayashi, D., Fukada, S., Guan, G., Todo, T., Senthilkumaran, B. & Nagahama, Y. (2002). Teleost ovarian carbonyl reductase-like 20 β -hydroxysteroid dehydrogenase: potential role in the production of maturation-inducing hormone during final oocyte maturation. *Biology of Reproduction* 66, 1498-1504.
- Tavolga, W.N. (1956). Visual, chemical and sound stimuli as cues in the sex discriminatory behaviour of the gobiid fish, *Bathygobius soporator*. *Zoologica* 41, 49-65.

- Thomas, P. (1994). Hormonal control of final oocyte maturation in sciaenid fishes. En: "Perspectives in Comparative Endocrinology" pp 619-625. (Davey K.G., Peter R.E. & Tobe S.S. eds.) .) Ottawa, National Research Council of Canada.
- Thomas, P., Zhu, Y. & Pace, M. (2002). Progesterone membrane receptors involved in the meiotic maturation of teleost oocytes: a review with some new findings. *Steroids* 67, 511-517.
- Trant, J.M. & Thomas, P. (1988). Structure-activity relationships of steroids in inducing germinal vesicle breakdown of Atlantic croaker oocytes *in vitro*. *General and Comparative Endocrinology* 71, 307-317.
- Trant, J.M. & Thomas, P. (1989). Isolation of a novel maturation-inducing steroid produced *in vitro* by ovaries of Atlantic croaker. *General and Comparative Endocrinology* 75, 397-404.
- Tyler, C.R. (1991). Vitellogenesis in salmonids. En "Proceedings of the 4th International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish" pp. 295-299. (Scott. A.P., Sumpter, J.P., Kime, D.E. & Rolfe, M.S., eds.) Sheffield.
- Tyler, C.R. & Sumpter, J.P. (1996). Oocyte growth and development in teleost. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 6, 287-318.
- Tyler, C.R., Sumpter, J.P. & Witthames, P.R. (1990). The dynamics of oocyte growth during vitellogenesis in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Biology of Reproduction* 43, 202-209.
- Ueda, H., Young, G., Crim, L.W., Kambegawa, A. & Nagahama, Y. (1983). 17 α , 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one: plasma levels during sexual maturation and *in vitro* production by the testes of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *General and Comparative Endocrinology* 51, 106-112.
- Ueda, H., Kambegawa, A. & Nagahama, Y. (1984). *In vitro* 11-ketotestosterone and 17 α , 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one production by testicular fragments and isolated sperm of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Journal of Experimental Zoology* 231, 435-439.
- Ueda, H., Kambegawa, A. & Nagahama, Y. (1995). Involvement of gonadotrophin and steroid hormones in spermiation in the amago salmon, *Oncorhynchus rhodurus*,

- and goldfish, *Carassius auratus*. *General and Comparative Endocrinology* 59, 24-30.
- Van Den Hurk, R., Schoonen, W.G.E.J., Van Zoelen, G.A. & Lambert, J.G.D. (1987). The biosynthesis of steroid glucuronides in the testes of the zebrafish, *Brachydanio rerio*, and their pheromonal function as ovulation inducers. *General and Comparative Endocrinology* 68, 179-188.
- Van Der Kraak, G. (1991). Role of calcium in the control of steroidogenesis in preovulatory ovarian follicles of goldfish. *General and Comparative Endocrinology* 81, 268-275.
- Van Der Kraak, G. & Biddiscombe, S. (1999). Polyunsaturated fatty acids modulate the properties of the sex steroid binding protein in goldfish. *Fish Physiology and Biochemistry* 20, 115-123.
- Van Weerd, J.H. & Richter, C.J.J. (1991). Sex pheromones and ovarian development in teleost fish. *Comparative Biochemistry and Physiology* 3B, 517-527.
- Van Weerd, J.H., Sukkel, M., Lambert, J.G.D. & Richter, C.J.J. (1991). GCMS-identified steroids and steroid glucuronides in ovarian growth stimulating holding water from adult African catfish, *Clarias gariepinus*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 98B, 303-311.
- Vermeirssen, E.L.M. & Scott, A.P. (1996). Excretion of free and conjugated steroids in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Evidence for branchial excretion of the maturation-inducing steroid, 17,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one. *General and Comparative Endocrinology* 101, 180-194.
- Vermeirssen, E.L.M. & Scott, A.P. (2001). Male priming pheromone is present in bile, as well as urine, of female rainbow trout. *Journal of Fish Biology* 58, 1039-1045.
- Wallace, R.A. (1985). Vitellogenesis and oocyte growth in nonmammalian vertebrates. En "Developmental Biology" pp. 127-177. (Browder, L.W. ed.) Plenum Press, New York.
- Wilson, E.O. & Bossert, W.H. (1963). Chemical communication among animals. *Recent Progress in Hormone Research* 19, 673-716.

- Warren, J.C., Murdock, G.L., Ma, Y., Goodman, S.R. & Zimmer W.E. (1993). Molecular cloning of testicular 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase: identity with aldose reductase. *Biochemistry* 32, 1401-1406.
- Yamashita, M. (1998). Molecular mechanism of meiotic maturation and arrest in fish and amphibian oocytes. *Cell & Developmental Biology* 9, 569-579.
- Yamashita, M., Fukuda, S., Yoshikuni, M., Bulet, P., Iria, T., Yamaguchi, A., Lou, Y., Zhao, Z. & Nagahama, Y. (1992). Purification and characterization of maturation-promoting factor in fish. *Developmental Biology* 149, 8-15.
- Yamauchi, K., Kagawa, H., Ban, M., Kasahara N. & Nagahama, Y. (1984). Changes in plasma estradiol-17 β and 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one levels during final oocyte maturation of the masu salmon, *Oncorhynchus rhodurus*. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 50, 2137.
- Yambe, H., Shindo, M. & Yamazi, F. (1999). A releaser pheromone that attracts males in the urine of mature female masu salmon. *Journal of Fish Biology* 55, 158-171.
- Yaron, Z. (1995). Endocrine control of gametogenesis and spawning induction in the carp. *Aquaculture* 129, 49-73
- Yoshikuni, M. & Nagahama, Y. (1991). Endocrine regulation of gametogenesis in fish. *Bulletin of the Institute of Zoology, Academia Sinica* 16, 139-172.
- Yoshikuni, M. Shibata, N. & Nagahama, Y. (1993). Specific binding of [3 H]- 17 α , 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one to oocyte cortices of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiology and Biochemistry* 11, 15-24.
- Young, G., Kagawa, H. & Nagahama, Y. (1982). Oocyte maturation in the amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*): In vitro effects of salmon gonadotropin, steroids, and cyanoketone (an inhibitor of 3 β -hydroxy- Δ^4 -steroid dehydrogenase). *Journal of Experimental Zoology* 224, 265-275.
- Young, G., Crim, L.W., Kagawa, H., Kambegawa, A. & Nagahama, Y. (1983). Plasma 17 α , 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one levels during sexual maturation of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*): correlation with plasma gonadotropin and *in vitro* production by ovarian follicles. *General and Comparative Endocrinology* 51, 96-106.
- Young, G., Adachi, S. & Nagahama, Y. (1986). Role of ovarian thecal and granulosa layers in gonadotropin-induced synthesis of a salmonid maturation-inducing

- substance (17α , 20β -dihydroxy-4-pregnen-3-one). *Developmental Biology* 118, 1-8.
- Yueh, W.S. & Chang, C.F. (1997). $17\alpha,20\beta,21$ -trihydroxy-4-pregnen-3-one and $17\alpha,20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one stimulated spermiation in protandrus black porgy, *Acanthopagrus schlegeli*. *Fish Physiology and Biochemistry* 17, 187-193.
- Zairin, M., Asahina K., Furukawa K. & Aida K. (1992) Plasma steroid hormone profiles during HCG induced ovulation in female walking catfish *Clarias batrachus*. *Zoological Science* 9, 607-617.
- Zheng, W., Strobeck, C. & Stacey, N.E. (1997). The steroid pheromone $17\alpha,20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one increases fertility and paternity in goldfish. *Journal of Experimental Biology* 200, 2833-2840.
- Zohar, Y., Breton, B. & Fostier, A. (1982). Gonadotropic function during the reproductive cycle of the female rainbow trout, *Salmo gairdneri*, in relation to ovarian steroid secretion: *In vivo* and *in vitro* studies. En "*Reproductive Physiology of Fish*" pp 14-18. (Richter, C.J.J. & Goos, H.J.Th., eds.) Wageningen.
- Zohar, Y., Goren, A., Fridkin, M., Elhanati, E. & Koch, Y. (1990). Degradation of gonadotropin-releasing hormones in the gilthead seabream, *Sparus aurata*. II. Cleavage of native salmon GnRH, mammalian LHRH, and their analogs in the pituitary, kidney and liver. *General and Comparative Endocrinology* 79, 306-319.

